

Vergleichende Charakterisierung
der Desoxyribonukleinsäuren
menschlicher Papillomviren (HPV)

von

Lutz Gissmann
aus Kaufbeuren

1977 # 120

Vergleichende Charakterisierung der Desoxyribonukleinsäuren menschlicher Papillomviren (HPV)

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt von
Lutz Gissmann
aus Kaufbeuren

Als Dissertation genehmigt
von den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1977

Vorsitzender der Prüfungskommission:	Professor Dr. E. Schweizer
Erstberichterstatter:	Professor Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatter:	Professor Dr. H. zur Hausen
Dritter Berichterstatter:	Professor Dr. W. Heumann



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Zelllinien	3
2.2. Biopsien	3
2.3. Desoxyribonukleinsäuren	3
2.4. Reagentien	4
2.5. Enzyme	5
2.6. Lösungen	6
2.7. Geräte	7
2.8. Reinigung von menschlichen Papillomvirus (HPV) aus Hautwarzen (<i>Verrucae vulgares</i> , <i>Verrucae plantares</i>)	8
2.9. Reinigung viraler DNS aus Viruspartikeln	11
2.10. Test auf vollständige Lyse der Viruspartikel	11
2.11. Transkription viraler DNS in vitro mit der Escherichia coli Polymerase	14
2.12. Zellkulturen	16
2.13. Extraktion zellulärer DNS	16
2.13.1. Extraktion aus Warzen	16
2.13.2. Extraktion aus Einschichtzellkulturen	17
2.14. DNS-RNS Hybridisierung auf Filtern	17
2.15. DNS-DNS Hybridisierung zur elektronenmikroskopischen Darstellung nicht homologer Bereiche in Hybridmolekülen	18

	Seite
2.16. Präparationen für die Elektronenmikroskopie	18
2.16.1. Negativkontrastierung	18
2.16.2. Darstellung viraler DNS	19
2.16.2.1. Mikrodiffusionsmethode	19
2.16.2.2. Spreitungstechnik	20
2.17. Längenmessung viraler DNS	20
2.18. Sedimentation viraler DNS in CsCl	20
2.19. CsCl-Gleichgewichtszentrifugation viraler DNS in der analytischen Ultrazentrifuge	21
2.20. Spaltung viraler DNS mit bakteriellen Restriktionsenzymen	22
2.21. Gelelektrophorese von DNS Fragmenten	22
2.22. Bestimmung des Molekulargewichtes der DNS Fragmente	23
2.23. Bezeichnung der DNS Fragmente	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Differenzierung der Desoxyribonukleinsäuren aus verschiedenen Virusisolaten	26
3.1.1. Spaltung der DNS mit der Restriktionsendonuklease von Haemophilus aegyptius (Hae III)	26
3.1.2. Kreuzhybridisierung der DNS aus verschiedenen Virusisolaten	28
3.2. Physikalische Charakterisierung der HPV DNS	29
3.2.1. Bestimmung der Dichte in CsCl	30
3.2.2. Bestimmung der Sedimentationskonstanten	30

	Seite
3.2.3. Bestimmung des Molekulargewichtes	32
3.2.4. Kartierung der HPV 1, 2 und 3 Genome mit Hilfe von Restriktionsenzymen	35
3.2.4.1. Spaltung der HPV DNS mit jeweils einem Enzym	35
3.2.4.2. Spaltung mit zwei Enzymen	39
3.2.4.2.1. Eco RI + Hind II	41
3.2.4.2.2. Eco RI + Hind III	42
3.2.4.2.3. Hind II + Hind III	43
3.2.4.2.4. Bam HI + Hind III	44
3.2.4.2.5. Bam HI + Hae III	44
3.2.4.2.6. Hind III + Hae III	46
3.2.4.2.7. Hind II + Hae III, Eco RI + Hae III	47
3.2.4.2.8. Hpa II + Hae III	49
3.2.4.3. Unvollständige Spaltung	51
3.2.5. Test auf nicht homologe Abschnitte im HPV 1 und HPV 2 Genom nach Heteroduplex-Bildung	55
4. Diskussion	58
5. Zusammenfassung	65
6. Literaturangaben	67



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548225_0066

1. Einleitung

1907 bewies Ciuffo durch Induktion von Vulgärwarzen (*Verrucae vulgares*) nach Verimpfung zellfreier Warzenextrakte in die menschliche Haut, daß diese gutartigen Hyperplasien der Epidermis (Nasemann, 1974) durch Viren verursacht werden. In der Folge führten die Verimpfungen von Extrakten aus Hautwarzen (*Verrucae vulgares*, *Verrucae plantares*), aus Warzen der Stimmbänder (*Larynxpapillome*) bzw. aus Genitalwarzen (*Condylomata acuminata*) in die Haut zur Entstehung von typischen Hautwarzen (Ulman, 1923; Serra, 1924; Goldschmidt und Kligman, 1958). Diese Befunde veranlaßten zu dem Schluß, daß die genannten Tumoren durch ein und dasselbe Agens hervorgerufen würden. In der Tat lassen sich in den Zellkernen von Geweben dieser Papillome ikosaedrische Viren mit einem Durchmesser von etwa 50 nm und einer dem SV 40 Virus ähnlichen Struktur nachweisen (Bunting, 1953; Dunn und Ogilvie, 1968; Boyle et al., 1973), sodaß auch in den neueren dermatologischen Lehrbüchern die Homogenität des menschlichen Papillomvirus (HPV) betont wird (Nasemann, 1974).

Da sich das Virus trotz vieler Versuche nicht in Zellkultur vermehren läßt (Rowson und Mahy, 1969), muß es zur Charakterisierung direkt aus klinischem Material isoliert werden. Verschiedene Autoren, die in der Vergangenheit die virale Desoxyribonukleinsäure sowie die Proteine untersuchten (Crawford und Crawford, 1963; Favre et al., 1975a und b), gingen stets von Viruspräparationen aus, die aus mehreren Warzen gereinigt worden waren. In

den letzten Jahren mehrten sich jedoch aufgrund biochemischer und epidemiologischer Untersuchungen (Almeida et al., 1969; Pass und Maizel, 1973; zur Hausen et al., 1974; zur Hausen et al., 1976) die Hinweise für eine mögliche Heterogenität innerhalb der menschlichen Papillomviren. Es erschien daher sinnvoll - unter der Annahme, daß jede Warze von einem Viruspartikel induziert wird (Murray et al., 1971) - zum Vergleich einzelner Klone die Viren aus verschiedenen Warzen zu charakterisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Desoxyribonukleinsäuren aus verschiedenen Viruspräparationen hinsichtlich einiger physikalischer Parameter, sowie durch Spaltung mit bakteriellen Restriktionsenzymen miteinander zu vergleichen, wobei die Untersuchungen auf das Virus aus Hautwarzen beschränkt bleiben mußten, da die Konzentration der Viruspartikel aus Larynxpapillomen und Condylomen für eine Charakterisierung mit den hier beschriebenen Methoden nicht ausreichte. Dabei ließen sich vier verschiedene menschliche Papillomviren (HPV 1 bis HPV 4) identifizieren, von denen drei (HPV 1, 2 und 3) offensichtlich nahe verwandt sind, während es sich bei HPV 4 um ein völlig unterschiedliches Agens handelt (Gissmann und zur Hausen, 1976; Gissmann et al., im Druck).

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

Vero: spontan ausgewachsene Linie von afrikanischen grünen Meerkatzen, eine allgemein gebräuchliche Zelllinie, die im Institut gehalten wird.

HEL: primäre menschliche Lungenfibroblasten, die im Institut von menschlichen Embryonen angelegt wurden.

2.2. Biopsien

Die für die Virusreinigungen verwendeten Papillome (Verrucae vulgares, Verrucae plantares, Condylomata acuminata und Larynxpapillome) wurden uns freundlicherweise von der HNO-Klinik, der dermatologischen Universitätsklinik, Erlangen sowie von Dr.G.Schmid, Erlangen zur Verfügung gestellt.

Die Materialien wurden in der Reihenfolge ihres Einganges mit WV-1, -2 usw. bezeichnet und bis zu ihrer Verarbeitung in 0.05 M Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl pH 8.0 bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

2.3. Desoxyribonukleinsäuren

Die als Längenmarker verwendete Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Bakteriophagen Lambda erhielten wir von W.Sugden, die Hind III

Fragmente von PM2 DNS wurden uns freundlicherweise von R.E.Streek zur Verfügung gestellt. Die radioaktiv markierte DNS von BK Virus (Gardner et al., 1971) wurde von H.J.Rziha im Institut gereinigt. Die DNS Dichtemarker (Escherichia coli K12 und Herpes simplex Virus Typ II) wurden mir von F.Schöffel bzw. B.Fleckenstein überlassen, die DNS von Adenovirus Typ 2 wurde von G.Werner präpariert.

2.4. Reagentien

- Agarose Seakem
Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA
- Cytochrom C
Sigma Chemical Company, St.Louis USA
- Nitrozellulosefilter, 0.45 um Porenweite
Sartorius. Göttingen
- PPO (2,5-Diphenyloxazol) und POPOP (1,4-Bis(5-phenyloxazolyl)-2
(-2))- benzol
Koch-Light Laboratories Ltd, Colbrook England
- Sephadex G 50
Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt/Main
- Tritium markiertes Adenosintriphosphat (ATP) und Cytidintriphosphat (CTP)
Amersham Buchler, Braunschweig
- Triton X-100
Röhm und Haas, Frankfurt/Main
- Visking Dialyseschlauch
Union Carbide, Chicago USA

- Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyl-
äthylendiamin (TEMED), Ammoniumpersulfat, Äthidiumbromid, 2-Mer-
captoäthanol, Spermidin, Uridintriphosphat (UTP), Guanosintri-
phosphat (GTP)
Serva, Heidelberg
- alle anderen Chemikalien von Merck, Darmstadt

2.5. Enzyme

- Trypsin aus Rinderpankreas, 1:250
Difco, Detroit USA
- Proteinase K aus Pilzen, chromatographisch gereinigt
Merck, Darmstadt
- Desoxyribonuklease (DNase) reinst, RNase frei
Serva Heidelberg
- Ribonuklease (RNase) aus Pankreas, elektrophoretisch gereinigt
Merck, Darmstadt
- Eco RI (Greene et al., 1974), Hpa II (Sharp et al., 1973) und
Hae III (Middleton et al., 1972) Restriktionsendonukleasen
Miles GmbH, Frankfurt/Main
- Bam HI (Wilson und Young, 1975), Sal I (Arrand et al., unver-
öffentlicht) und Sma I (Greene und Mulder, unveröffentlicht)
Restriktionsendonukleasen wurden freundlicherweise von C.Mulder
überlassen
- Hind II (Smith und Wilcox, 1970) und Hind III (Old et al., 1975)
Restriktionsendonukleasen wurden uns freundlicherweise von
W.Doerfler bzw. von R.E.Streek zur Verfügung gestellt.

Die einzusetzende Menge an Restriktionsendonukleasen wurde durch Spaltung definierter Mengen von Adenovirus Typ 2 oder Lambda DNS bestimmt.

2.6. Lösungen

- MEM, minimal essential medium nach Eagle (1959)
Grand Island Biological Co., Grand Island N.Y. USA
- Rehatuin, fötales Kälberserum
Reheis Chemical Company, Phoenix Arizona USA
- TT33 Szintillator:
40 g PPO, 2 g POPOP, 3.33 l Triton X-100, 6.66 l Toluol
- 20 X SSC (Stammlösung, die vor Gebrauch entsprechend verdünnt wurde):
3 M NaCl = 175.32 g
0.3 M Natriumcitrat = 88.23 g
ad 1000 ml H₂O
- PBS (phosphate buffered saline, Dulbecco und Vogt, 1954):
8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄,
0.167 g CaCl₂ X 4 H₂O, 0.1 g MgCl₂ X 6 H₂O ad 1000 ml H₂O
- Trypsin Lösung:
8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.1 g Na₂HPO₄ X 2 H₂O, 1 g D(+) Glukose,
3 g Tris, 2.5 g Trypsin, 5 mg Phenolrot, pH 7.5 ad 1000 ml H₂O
- Tris-EDTA (TE):
10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan = 1.21 g
0.1 mM EDTA (Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz)
= 0.037 g ad 1000 ml H₂O, mit HCl auf pH 8.1. eingestellt
(wurde vor Gebrauch aus einer 100 fach konzentrierten Stammlösung verdünnt)

2.7. Geräte

- Zentrifugen: Christ, UJ III S
Hettich, Rotosilenta K
- Ultrazentrifugen: Beckman, L 3-50, L 5-50 mit SW 27 und SW 56
Rotoren
- Analytische Ultrazentrifuge: Beckman, Modell E mit photoelectric
scan und 10 Zoll Schreiber
AnF Ti Rotor
- Szintillationszähler: Packard, Tricarb 3375
Berthold und Friseke, Betaszint 5000
- Spektralphotometer: Zeiss, PMQ II
Gilford 240
- Elektronenmikroskop: Zeiss 10
- Längenmessgerät: Brühl, LM 1
- Hochvakuumanlage: Edwards E12E
- Lyophilisiergerät: Gardiner, N.Y. USA
- Gefriertruhen: "
- Elektrophoresekammern: Hoefer Sc.Instr., San Franzisco USA
- Durchlichtmikroskop: Leitz, Diavert
- UV-Lampe: C51, Ultra Violet Products Inc., San Gabriel USA
- Refraktometer nach Abbe: Zeiss 88396

2.8. Reinigung von menschlichem Papillomvirus (HPV) aus Hautwarzen (Verrucae vulgares, Verrucae plantares)

Bei der Virusreinigung wurde von jeweils einer Warze ausgegangen. Das Gewebe wurde zerschnitten, mit Seesand in einem Mörser zerrieben und dann in 2-5 ml Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl pH 8.0 aufgeschwemmt. Die Suspension wurde für 1 h bei 37°C in 0.01% Trypsin inkubiert (Favre et al., 1975a) und anschließend bei 4°C und 2000 X g abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Elektronenmikroskop auf Viruspartikel hin überprüft (s. 2.16.1.); bei Virus-positiven Isolaten (Abb. 1) wurde das Sediment in dem o.g. Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und die vereinigten Überstände für 75 min bei 4°C und 80 000 X g in einem SW 27 Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml 0.05 M Natriumphosphatpuffer, 0.05 M NaCl, 0.001 M EDTA, pH 7.4 resuspendiert und die Lösung mit festem CsCl auf eine Dichte von 1.34 g/ml eingestellt. Zur Berechnung der CsCl-Einwaage wurde die Formel von Robinson und Stokes (1955) verwendet:

$$g \text{ CsCl}/100 \text{ ml Lösung (w/v)} = 137.48 \times \rho_i - 138.11$$

(ρ_i : Eingangsdichte)

Nach Gleichgewichtszentrifugation im SW 56 Rotor bei 110 000 X g über 40 h bei 20°C wurden die Röhrchen von unten mit einer Kanüle angestochen und der Gradient in Fraktionen von etwa 200 µl gesammelt. Um den Verlauf des CsCl-Gradienten zu bestimmen, wurden je 10 µl einiger Fraktionen refraktometrisch vermessen und die Dich-

te (ρ) aus dem refraktiven Index (n_D^{25}) wie folgt berechnet:

$$\rho = 10.800 n_D^{25} - 13.500 \text{ (Weigle et al., 1959)}$$

Anschließend wurden alle Fraktionen mit 200 μ l Wasser aufgefüllt und die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Abb. 2 zeigt den Verlauf der Extinktion in einem solchen Gradienten. Die Fraktionen mit einer Dichte von 1.32 - 1.34 g/ml (Partikel mit DNS, s. Abb. 1a) bzw. 1.29 g/ml (leere Partikel, s. Abb. 1b) wurden getrennt gesammelt und gegen 3 X 2 l TE dialysiert.

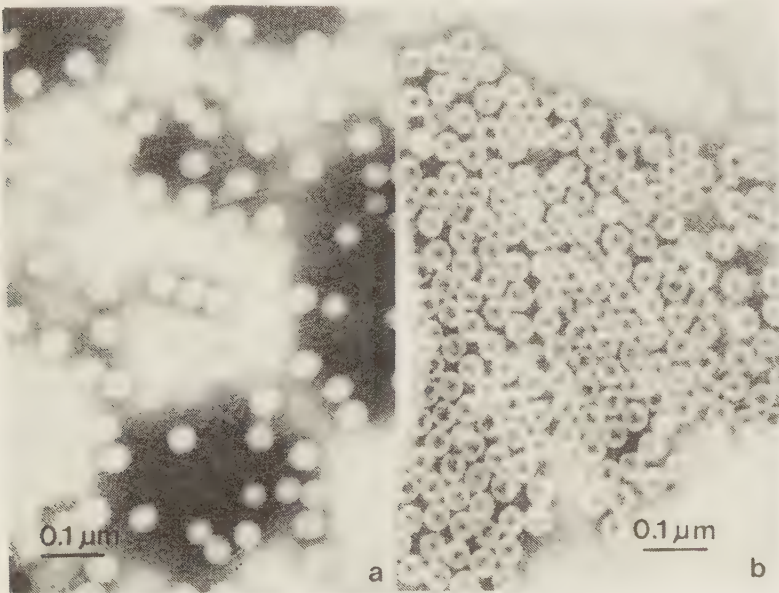


Abb. 1

Elektronenmikroskopische Aufnahme von menschlichem Papillomvirus nach Extraktion aus einer Hautwarze und anschließender Reinigung im CsCl-Gradienten. Negativkontrastierung mit 2% PWS, pH 7.0

a. Viruspartikel mit DNS mit einer Dichte von 1.34 g/ml

b. Viruspartikel ohne DNS mit einer Dichte von 1.29 g/ml

Bei Isolaten mit hoher Viruskonzentration zeigten sich nach CsCl-Gleichgewichtszentrifugation zwei sichtbare Banden symmetrisch zur Mitte des Röhrchens. Diese wurden durch seitliches Anstechen des Röhrchens gesammelt und wie oben beschrieben dialysiert:

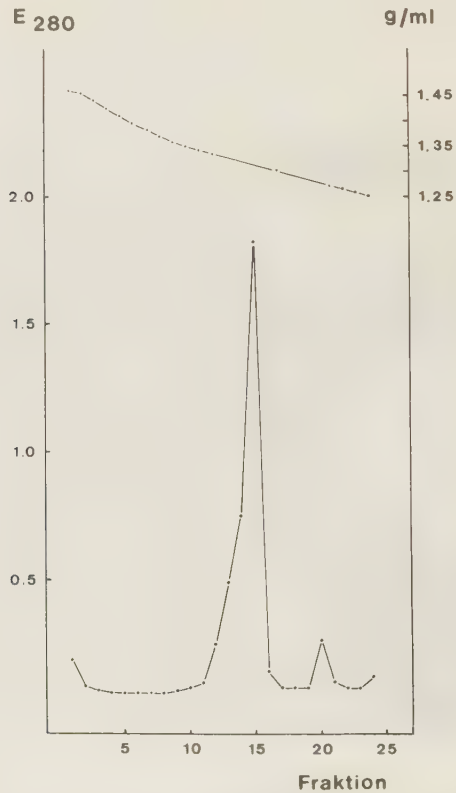


Abb. 2

Bandungsverhalten von HPV nach Extraktion aus einer Plantarwarze (WV-432) im CsCl-Gradienten. Die Fraktionen 12-16 wurden zur Extraktion der viralen DNS (2.9.) vereinigt.

2.9. Reinigung viraler DNS aus Viruspartikeln

Zu der gegen TE dialysierten Virussuspension wurde 25%iges Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben (Endkonzentration 1%) und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von festem CsCl (Endkonzentration 1 M) wurden die Proteine durch Zentrifugation bei 2000 X g und 0°C für 30 min abgetrennt (Tai et al., 1972). Um die kovalent geschlossene DNS = Komponente I (Ko I) von der zirkulären (Ko II) bzw. der linearen (Ko III) abzutrennen (Abb. 3a), wurde der Überstand nach Dialyse gegen TE mit festem CsCl auf eine Dichte von 1.56 g/ml gebracht und mit Äthidiumbromid (200 µg/ml) bei 110 000 X g für 40 h bei 20°C im SW 56 Rotor zentrifugiert (Radloff et al., 1967). Die unter UV-Licht sichtbaren DNS-Äthidiumbromidbanden bei einer Dichte von 1.60 g/ml (Ko I) und 1.56 g/ml (Ko II + III) wurden getrennt gesammelt und das Äthidiumbromid durch dreimalige Extraktion mit Wasser-gesättigtem n-Butanol aus der wässrigen Phase entfernt. Die DNS wurde nach Extraktion mit Äther gegen 3 X 2 l TE dialysiert und in einem Spektralphotometer bei Wellenlängen zwischen 220 und 320 nm gemessen. Die Konzentration wurde aus der Extinktion bei 260 nm bestimmt. ($1 \text{ OD}_{260} \hat{=} 50 \text{ µg/ml}$).

2.10. Test auf vollständige Lyse der Viruspartikel

Um die Deproteinisierung der viralen DNS zu kontrollieren, wurden jeweils gleiche Volumina ein und desselben Virusisolates zum Vergleich für 15 min bei 37°C mit 1% SDS bzw. für 4 min bei 37°C

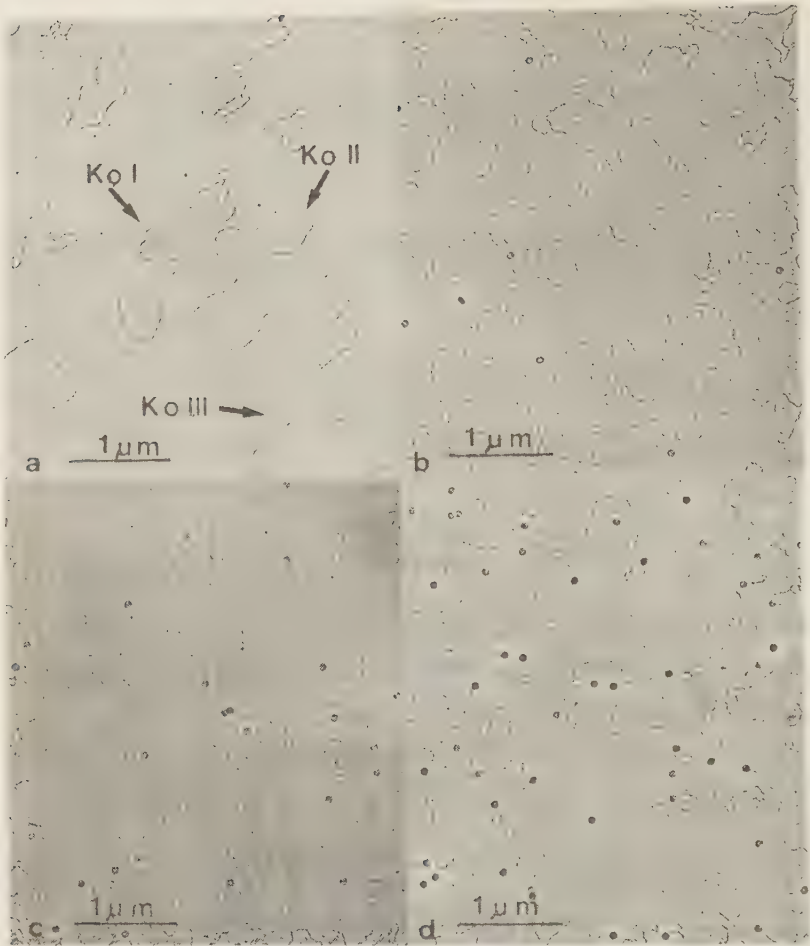


Abb. 3

Darstellung von HPV DNS im Elektronenmikroskop nach verschiedenen Methoden der Extraktion

a. Extraktion der DNS mit 4 M Guanidiumchlorid + Chloroform-Isoamylalkohol. Die einzelnen Komponenten der viralen DNS sind mit Pfeilen markiert.

b. Lyse der Viruspartikel mit 1% SDS (15 min, 37°C), Fällung der Proteine mit 1 M CsCl

c. Lyse der Partikel mit 0.2% SDS (4 min, 37°C), Fällung der Proteine mit 1 M CsCl

d. unbehandelte Virussuspension

mit 0.2% SDS inkubiert und anschließend wie unter 2.9. beschrieben weiterbehandelt. Als Kontrollen dienten die unbehandelte Virussuspension sowie die nach der Methode von Robinson et al. (1973) extrahierte DNS. Dazu wurde die Virussuspension mit dem gleichen Volumen 8 M Guanidiniumchlorid in TE für 3 min bei 0°C inkubiert und anschließend mit dem 10fachen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 + 1) für 10 min bei 4°C extrahiert. Die wässrige Phase wurde gegen TE dialysiert. Die Analyse der einzelnen Proben im Elektronenmikroskop (s. 2.16.2.1.) ergab nach Extraktion mit Guanidiniumchlorid eine saubere DNS Präparation (Abb. 3a), während die DNS nach Inkubation mit 0.2% SDS noch zum großen Teil mit viralem Protein assoziiert war (Abb. 3c). Ein Vergleich mit der unbehandelten DNS (Abb. 3d) ergab, daß es sich bei diesen Proteinen möglicherweise um ganze Viruskapside handelt. Auch nach Behandlung mit 1% SDS waren nicht alle DNS Moleküle deproteinisiert (Abb. 3d). Dieser Methode wurde jedoch für die routinemäßige Aufarbeitung der Virusisolate der Vorzug vor der Extraktion mit Guanidiniumchlorid gegeben, da sie auch eine Präparation der viralen Proteine erlaubt, die parallel zur DNS an diesem Institut untersucht werden.

2.11. Transkription viraler DNS in vitro mit der Escherichia coli Polymerase (Burgess, 1969)

Zur Herstellung komplementärer RNS (cRNS) wurden 0.2-5 µg viraler DNS nach der Vorschrift von Wolf (1974) transkribiert. Dazu wurde nach Möglichkeit gereinigte Komponente I eingesetzt. Nur bei Virusisolaten mit geringer DNS Ausbeute wurde auf einen CsCl-Äthidiumbromidgradienten verzichtet und Ko I + II zur Transkription verwendet.

Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 50 min in Polymerasepuffer (0.04 M Tris-HCl, pH 7.7, 0.01 M MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol, 0.2 M KCl, 0.5 mg/ml Rinderserumalbumin, 0.4 mM K₂HPO₄); ein typischer Ansatz (0.6 ml) enthielt:

5 µg DNS (lyophilisiert)
40 nmol ³H-CTP (")
40 nmol ³H-UTP (")
40 nmol ATP, 40nmol GTP
20 mmol Spermidin
20 µl Polymerase (Wolf, 1974)

Nach Beendigung der Reaktion wurde mit 50 µg/ml RNase (DNase frei) und 40 µg/ml Hefe RNS inkubiert, um die DNS Matrix zu verdauen. Zur Entfernung der Proteine wurde die Lösung anschließend mit gleichem Volumen Phenol (gesättigt mit TE) geschüttelt. Die synthetisierte RNS wurde dann über eine Säule mit Sephadex G-50 medium (38 X 1.3 cm) von den nicht eingebauten Triphosphaten getrennt (Abb. 4) und in 45% Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

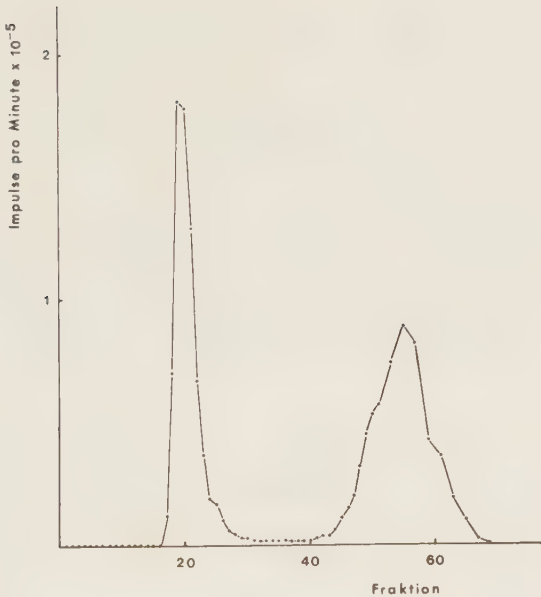


Abb. 4

Trennung der *in vitro* synthetisierten HPV cRNS von den nicht eingebauten Ribonukleosidtriphosphaten über eine Sephadex G-50 Säule. Von den einzelnen Fraktionen (Volumen etwa 1 ml) wurden je 10 μ l mit 10 ml TT33 im Szintillationszähler vermessen. Der Einbau von Radioaktivität in die cRNS betrug in diesem Experiment 45%. Die Fraktionen 17-24 wurden vereinigt und nach Zugabe von 20 μ g/ml Hefe RNS aufbewahrt.

2.12. Zellkulturen

Die an ihrer Unterlage festwachsenden Zellen (Einschichtzellkulturen) wurden bei 37°C in Rouxflaschen mit 100 ml MEM gehalten. Das Medium wurde mit 0.35 mg/ml L-Glutamin, 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie mit 10% fötalem Kälberserum supplementiert und wöchentlich gewechselt. Sobald sich ein zusammenhängender Zellrasen auf der Glasoberfläche gebildet hatte, wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml einer 0.25%igen Trypsinlösung (s. 2.6.) proteolytisch vom Glas gelöst und auf 3-4 neue Flaschen verteilt.

2.13. Extraktion zellulärer DNS

2.13.1. Extraktion aus Warzen

1-5 g Warzengewebe wurden in kleine Stücke geschnitten und in einer Reibschale mit etwa der gleichen Menge Seesand und 1-5 ml TE zerrieben (zur Hausen et al., 1970). Anschließend wurde für 1 h mit 1% SDS bei Zimmertemperatur und 1 h mit 100 µg/ml Proteinase K (1 h bei 37°C vorinkubiert) behandelt. Zur Extraktion wurde das gleiche Volumen Phenol (gesättigt mit TE), pH 8.1 zugegeben. Diese Mischung wurde für 10 min kräftig geschüttelt und dann zur Trennung der Phasen bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen und noch 2-3mal mit Phenol extrahiert. Anschließend wurde gegen 3 X 2 l TE dialysiert und für 30 min mit 20 µg/ml RNase behandelt, die durch eine 30minütige Vorbehandlung bei 80°C DNase frei war. Nach noch-

maliger Extraktion mit Phenol und intensiver Dialyse gegen TE wurden Konzentration und Reinheit der DNS anhand eines Spektrums der optischen Dichte zwischen 220 und 320 nm bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.13.2. Extraktion aus Einschichtzellkulturen

Zur Extraktion der DNS aus menschlichen Fibroblasten (HEL) wurden die Zellen nach Abgießen des Nährmediums in der Rouxflasche mit 2×10 ml PBS gewaschen, anschließend durch Zugabe von Trypsin von der Glasoberfläche gelöst und in ein Reagenzglas überführt. Nach Zentrifugation bei $1000 \times g$ (5 min, 4°C) wurden die Zellen noch zweimal mit TE gewaschen und in TE (2 ml pro Ausgangsflasche) resuspendiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 2.13.1. beschrieben.

2.14. DNS-RNS Hybridisierung auf Filtern (zur Hausen et al., 1974)

2-100 ng der zu untersuchenden viralen DNS wurden mit $50 \mu\text{g}$ zellulärer DNS aus HEL- oder Vero Zellen aufgefüllt, 15 min bei 100°C denaturiert und durch vorsichtiges Saugen auf ein Nitrozellulosefilter, das in $2 \times \text{SSC}$ vorgequollen war, aufgebracht. Die feuchten Filter wurden für 4 h bei 80°C inkubiert, um die DNS fest an die Nitrozellulose zu binden.

Die radioaktive cRNS wurde mit $0.1 \times \text{SSC}$ auf etwa 10^6 Ipm/ml verdünnt, 10 min lang gekocht, bei 0°C abgeschreckt und anschließend im Verhältnis $1 + 9$ mit $2.6 \times \text{SSC}$, 56.5% Formamid und

0.5% SDS gemischt. Pro Filter wurde 1 ml dieses Cocktails zugegeben und für 6 Tage bei 44°C inkubiert. Danach wurden die Filter intensiv mit 2 X SSC gewaschen und mit je 5 ml RNase (200 µg/ml, 30 min bei 80°C vorinkubiert) in 2 X SSC für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die noch feuchten Filter für 30 min in je 10 ml TT33 geschüttelt und anschließend im Szintillationszähler vermessen.

2.15. DNS-DNS Hybridisierung zur elektronenmikroskopischen Darstellung nicht homologer Bereiche in Hybridmolekülen

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden je 50 ng der zu vergleichenden Desoxyribonukleinsäuren in 20 mM EDTA mit 100 mM NaOH für 10 min bei Zimmertemperatur denaturiert und anschließend mit 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 neutralisiert (Davis, pers. Mitteilung). Die Renaturierung der Moleküle erfolgte in 50% Formamid bei Zimmertemperatur für 15-90 min. Danach wurde die Probe bis zur Präparation für die Elektronenmikroskopie (s. 2.16.2.2.) bei 0°C gehalten.

2.16. Präparationen für die Elektronenmikroskopie

2.16.1. Negativkontrastierung

Zur Darstellung von Viruspartikeln wurden die Proben nach der Methode von Valentine et al. (1968) präpariert. Ein dünner Kohlefilm wurde auf die Oberfläche der Virussuspension flottiert, nach etwa 3 min in 2%ige Phosphorwolframsäure (PWS), pH 7.0 überführt

und anschließend mit einem Neopren-beschichteten Kupfernetzchen aufgetupft.

Bei Virusproben mit sehr geringer Partikelkonzentration wurden 1-2 μ l der Suspension direkt auf ein mit Parlodium und Kohle beschichtetes Kupfernetzchen gebracht und bis zum Eintrocknen bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurde etwa die gleiche Menge PWS aufgetropft und sofort mit einem Filterpapier seitlich abgezogen.

2.16.2. Darstellung viraler DNS

2.16.2.1. Mikrodiffusionsmethode

Zur Darstellung doppelsträngiger DNS im Elektronenmikroskop wurde die Mikrodiffusionsmethode von Lang und Mitani (1970) in einer Modifikation ohne Formaldehyd (Bornkamm et al., 1976) verwendet. Tropfen von 50 μ l mit 0.2 M Ammoniumacetat, 0.0027% Cytochrom C, 0.1 mM EDTA und 100 ng/ml DNS wurden auf eine Plastikoberfläche gesetzt. Nach 45-60 min bei Zimmertemperatur wurde der Protein-DNS Film mit einem Parlodium-beschichteten Kupfernetzchen aufgetupft, mit 0.0044% Uranylacetat in 90%igem Äthanol für 30 sec kontrastiert, getrocknet und bei 2×10^{-5} Torr mit Pt/Pd unter Rotation bedampft (Winkel 7°).

2.16.2.2. Spreitungstechnik

Einzel- und doppelsträngige DNS wurden nach der von Davis et al. (1971) beschriebenen Modifikation der Kleinschmidt-Technik präpariert. Dazu wurden 5-10 μ l einer Lösung von 500 ng/ml DNS, 60% Formamid, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 5 mM EDTA und 0.0075% Cytochrom C auf eine Hypophase mit 10% Formamid, 10 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM EDTA gespreitet. Der DNS-Protein Film wurde mit einem Parlodium-beschichteten Kupfernetzchen aufgetupft und wie unter 2.16.2.1. beschrieben kontrastiert und bedampft.

2.17. Längenmessung viraler DNS

Die zu vermessenden DNS Moleküle wurden mit 5000facher Vergrößerung photographiert. Ihre Länge wurde nach Projektion der Negative unter etwa 7facher Vergrößerung durch Abfahren der Konturen mit einem automatischen Längenmessgerät bestimmt. Das Molekulargewicht ergab sich durch Vergleich mit der DNS des Bakteriophagen Lambda als Standard in demselben Präparat.

2.18. Sedimentation viraler DNS in CsCl

Zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten der einzelnen Komponenten der viralen DNS wurden 4.1 ml einer neutralen CsCl-Lösung der Dichte 1.50 g/ml mit 5 μ g der DNS (Ko I, II und III) in 0.1 ml TE überschichtet und für 6.5 h bei 110 000 X g und 25°C in einem SW 56 Rotor zentrifugiert (Hall et al., 1973). 100 μ l

Fractionen wurden durch Anstechen des Röhrchen gesammelt. Jede Fraktion wurde mit 200 µl TE aufgefüllt und gegen 3 X 2 l TE dialysiert. Anschließend wurden 40 µl jeder Fraktion durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel getestet.

Als Marker diente mit Tritium markierte DNS von BK Virus (Ko I, II und III), die im Parallelröhren desselben Laufs sedimentiert wurde. Von den einzelnen Fraktionen wurden je 20 µl mit 10 ml TT33 aufgefüllt und im Szintillationszähler vermessen.

2.19. CsCl-Gleichgewichtszentrifugation viraler DNS in der analytischen Ultrazentrifuge

Zur Bestimmung der Dichte der viralen DNS wurden 1-2 µg HPV DNS mit etwa 0.5 µg DNS von Escherichia coli K12 bzw. von Herpes simplex Typ II Virus gemischt und mit festem CsCl auf eine Eingangsdichte von 1.707 g/ml eingestellt. 400 µl davon wurden in der analytischen Ultrazentrifuge für 24 h bei 44 000 Upm und 20°C zur Ausbildung des Dichtegradienten zentrifugiert. Nach dieser Zeit wurde die Extinktion bei 260 nm längs des Gradienten gemessen.

Die Berechnung des Gehaltes an Guanin + Cytosin (G + C) aus der Dichte in CsCl (ρ) erfolgte nach der Formel von Schildkraut et al. (1962):

$$G + C \text{ (Mol-Prozent)} = \frac{\rho - 1.660}{0.098} \times 100$$

2.20. Spaltung viraler DNS mit bakteriellen Restriktionsenzymen

300 ng HPV DNS wurde in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (100 mM für das Enzym Eco RI), 6 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-Mercaptoäthanol und 15 mM KCl mit 1-10 μ l des entsprechenden Enzyms für 3-16-h bei 30°C oder 37°C inkubiert (Reaktionsvolumen 0.5 ml). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 0.5 M EDTA beendet. Nach Entfernen der Proteine durch Extraktion mit gleichem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 + 1) wurde die DNS in 0.21 M Natriumacetat mit dem 2.5-3fachen Volumen Äthanol für einige Stunden bei -20°C präzipitiert und danach bei 110 000 X g und 0°C für 40 min in einem SW 56 Rotor abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 20 μ l von 1:20 verdünntem Elektrophoresepuffer (s. 2.21.), 20% Sucrose und 0.06% Bromphenolblau aufgenommen und zur Auftrennung der einzelnen Fragmente in die beim Gießen des Gels ausgesparten Taschen aufgetragen.

2.21. Gelelektrophorese von DNS Fragmenten

Zur Auftrennung der fragmentierten DNS wurden - je nach zu erwartender Fragmentgröße - folgende Gele verwendet:

- 0.7- oder 1%ige Agarosegele (18 X 12 X 0.3 cm)
- 4%ige Polyacrylamidgele (= 3.8% Acrylamid, 0.2% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.1% N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin; 18 X 12 X 0.1 cm)
- Gradientengele von 2-8% Polyacrylamid zur Stabilisierung mit 0-20% Sucrose (18 X 12 X 0.1 cm)

Die Agarose wurde durch 20minütiges Kochen gelöst, in der entsprechenden Verdünnung bei einer Temperatur von etwa 60°C gegossen und zum Erstarren bei Zimmertemperatur belassen. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von 0.25% Ammoniumpersulfat katalysiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 V (Agarosegele) oder 100 V (Polyacrylamidgele) und 4°C. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 40 mM Tris-HCl, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 7.8 (Danna et al., 1973), das der Probe zugesetzte Bromphenolblau diente als Marker und wanderte wie DNS mit einem Molekulargewicht von etwa 0.1×10^6 d.

Die Gele wurden für 1 h in 2 µg/ml Äthidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) mit einer Polaroid Land Kamera fotografiert.

2.22. Bestimmung des Molekulargewichtes der DNS Fragmente

Die Molekulargewichte der DNS Fragmente wurden mit Hilfe von DNS bekannter Größe bestimmt. Dazu wurden die Wanderungsstrecken der einzelnen Fragmente gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Als Marker dienten die Fragmente von PM2 DNS, die nach Spaltung mit Hind III erhalten worden waren; ihre Molekulargewichte betragen 3.5×10^6 d, 1.3×10^6 d, 0.6×10^6 d, 0.29×10^6 d, 0.28×10^6 d, 0.17×10^6 d und 0.065×10^6 d (Streek, pers. Mitteilung). Abb. 5 zeigt die Molekulargewichtsbestimmung von gespaltenen HPV DNS in einem 4%igen Polyacrylamidgel.

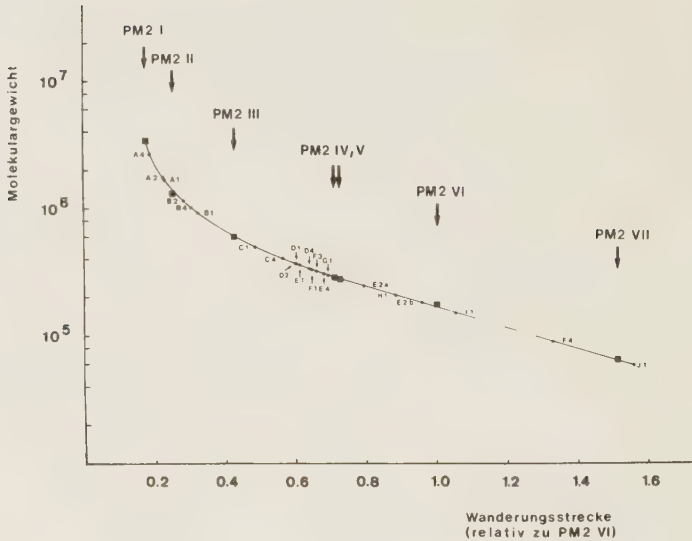


Abb. 5

Molekulargewichtsbestimmung von HPV 1, 2, 3 und 4 DNS nach Spaltung mit Hae III (s. Abb. 6). Die Wanderungsstrecken der Fragmente wurden relativ zum Fragment PM2 VI (0.17×10^6 d) aufgetragen. Zur Bezeichnung der Fragmente s. 2.23.

2.23. Bezeichnung der DNS Fragmente

Die nach Spaltung mit den verschiedenen Restriktionsenzymen erhaltenen Fragmente von HPV 1 oder HPV 4 wurden nach ihrer Größe

in alphabetischer Reihenfolge mit 1 oder 4 hinter dem Großbuchstaben bezeichnet (z.B.: Hae III Fragment A1). Die Fragmente von HPV 2 und HPV 3 erhielten dieselbe Bezeichnung wie die HPV 1 Fragmente, wenn sie mit diesen identisch waren. Andernfalls wurde der Unterschied durch eine 2 oder 3 hinter dem Großbuchstaben dokumentiert (z.B.: Hae III Fragment F3). Liegt innerhalb eines Fragmentes von HPV 1 DNS bei HPV 2 mit demselben Enzym eine zusätzliche Spaltstelle, so wurde dies durch eine weitere Unterteilung in a und b gekennzeichnet (z.B.: Hae III Fragment E2a, s. Abb. 20).

3. Ergebnisse

3.1. Differenzierung der Desoxyribonukleinsäuren aus verschiedenen Virusisolaten

3.1.1. Spaltung der DNS mit der Restriktionsendonuklease von Haemophilus aegyptius (Hae III)

Um die aus einzelnen Hautwarzen isolierten menschlichen Papillomviren (HPV) miteinander zu vergleichen, wurden ihre Desoxyribonukleinsäuren mit bakteriellen Restriktionsenzymen gespalten, die jeweils nur bestimmte Basensequenzen erkennen (Nathans und Smith, 1975) und so verschiedene Genome in unterschiedlich große Fragmente schneiden. Eine Analyse dieser Bruchstücke in der Gelelektrophorese ermöglicht eine eindeutige Differenzierung unterschiedlicher Desoxyribonukleinsäuren. Hae III von Haemophilus aegyptius spaltet von allen getesteten Endonukleasen die HPV DNS am häufigsten. Daher wurde dieses Enzym verwendet, um die einzelnen Viruspräparationen miteinander zu vergleichen.

Eine Analyse von 47 verschiedenen Desoxyribonukleinsäuren, die aus den Viren jeweils einer Warze extrahiert worden waren, erlaubte die Unterscheidung von insgesamt vier verschiedenen menschlichen Papillomviren, die in der Reihenfolge ihrer Identifizierung als HPV 1, 2, 3 und 4 bezeichnet wurden. Abb. 6 zeigt eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese der mit Hae III gespaltenen DNS von HPV 1-4. HPV 1 und 3 sind hinsichtlich ihres Spaltungsmusters

HPV 1 HPV 2 HPV 3 HPV 4

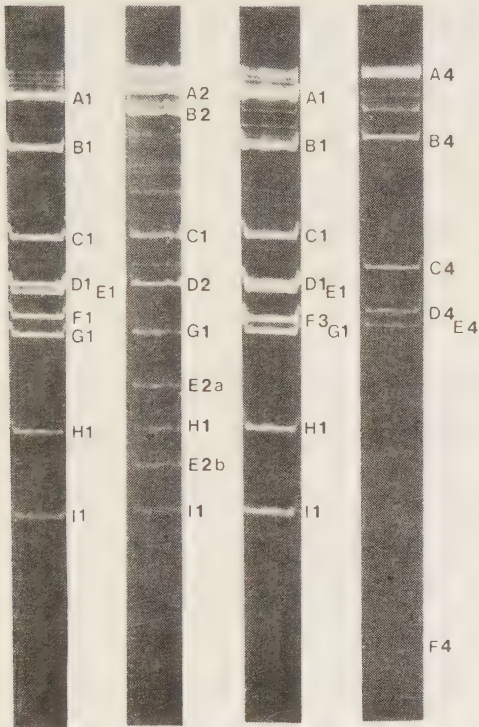


Abb. 6

Trennung der DNS von HPV 1-4 nach Spaltung mit Hae III in einem 4%igen Polyacrylamidgel. Die Fragmente wurden nach ihrer Größe alphabetisch gekennzeichnet (s. 2.23.). Die in allen Proben auftretenden unvollständig gespaltenen Fragmente (s. 3.2.4.3.) wurden hier nicht eigens markiert. Der Unterschied zwischen den Fragmenten D1 und D2 war nur durch Elektrophorese von HPV 1 und HPV 2 DNS in derselben Probe zu identifizieren. Die Molekulargewichte der einzelnen Fragmente sind in Tabelle 3b zusammengefaßt. Für die dort zusätzlich aufgeführten Fragmente J1-O1 s. Abb. 11f.

identisch mit Ausnahme des Fragmentes F, das bei HPV 3 um etwa 0.01×10^6 d kürzer erscheint. HPV 1 und 2 sind identisch hinsichtlich der Fragmente C, G, H, I, K, L, M, N und O (für die Fragmente J-O s. Abb. 11 f) und unterscheiden sich in A, B, D, E, F und J. HPV 4 DNS zeigt hingegen ein völlig unterschiedliches Spaltungsmuster verglichen mit HPV 1, 2 und 3.

Tabelle 1 zeigt die Anzahl der als HPV 1-4 identifizierten Virus-isolate.

	HPV 1	HPV 2	HPV 3	HPV 4	insgesamt untersuchte Warzen
Anzahl	41 ⁺	3 ⁺	2	2	47 ⁺

Tabelle 1

Anzahl der durch Spaltung mit Hae III identifizierten HPV 1-4 Isolate

⁺: In einem Fall wurden HPV 1 und HPV 2 aus derselben Warze isoliert.

3.1.2. Kreuzhybridisierung der DNS aus verschiedenen Virusisolaten

Wie die Spaltung der einzelnen DNS Präparationen mit der Hae III Restriktionsendonuklease zeigte, handelt es sich bei HPV 1, 2 und 3 offensichtlich um nahe verwandte Viren, von denen sich HPV 4 erheblich unterscheidet. Diese Tatsache ließ sich durch Hybridisierungsexperimente mit komplementärer RNS (cRNS), die in vitro von HPV 1 bzw. HPV 4 DNS transkribiert worden war, und DNS von HPV 1, 2, 3 und 4 bestätigen.

Tabelle 2 zeigt, daß HPV 1 cRNS mit HPV 1, 2 und 3 DNS in etwa gleichem Umfang hybridisiert, während mit HPV 4 DNS keine positive Reaktion gefunden wurde. Im Kontrollexperiment hybridisierte HPV 4 cRNS nur mit der homologen DNS.

DNS	HPV 1 cRNS	HPV 4 cRNS
HPV 1	9.2	0.13
HPV 2	8.9	n.u.
HPV 3	12.6	n.u.
HPV 4	0.06	2.0

Tabelle 2

Prozent Hybridisierung zwischen 20 ng gereinigter HPV 1-4 DNS mit der von HPV 1 bzw. von HPV 4 transkribierten cRNS ($5-10 \times 10^4$ Ipm pro Filter)

n.u.: nicht untersucht

3.2. Physikalische Charakterisierung der HPV DNS

Die im folgenden beschriebenen Experimente konnten - mit Ausnahme der Molekulargewichtsbestimmung - nur mit der DNS von HPV 1, 2 und 3 durchgeführt werden, da nur etwa 1-2 µg HPV 4 DNS zur Verfügung standen, die zum größten Teil für die Spaltung mit Hae III bzw. zur Transkription eingesetzt wurden.

3.2.1. Bestimmung der Dichte in CsCl

Die Dichte der HPV DNS wurde durch CsCl-Gleichgewichtszentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmt. Als Marker wurden Escherichia coli K12 DNS ($\rho = 1.710$ g/ml, Baptist et al., 1969) und Herpes simplex Typ II DNS ($\rho = 1.727$ g/ml, Ludwig, 1972) verwendet. Abb. 7 zeigt die Lage von HPV DNS nach Zentrifugation in CsCl. Aus dem Abstand zu den Markern ergibt sich eine Dichte von 1.700 g/ml. Dieser Wert entspricht einem Gehalt an Guanin + Cytosin von 41%.

Die Desoxyribonukleinsäuren von HPV 1, 2 und 3 banden im CsCl-Gradienten an derselben Stelle (Abb. 7), d.h., sie sind hinsichtlich ihrer Dichte nicht zu unterscheiden.

3.2.2. Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Sedimentationskonstanten der drei Komponenten von HPV 1 DNS wurden durch Zentrifugation in CsCl der Dichte 1.50 g/ml, pH 7.0 ermittelt. Als Marker diente radioaktiv markierte BK DNS, deren Lage im Parallelröhrchen desselben Laufs bestimmt wurde. Die Analyse der einzelnen Fraktionen im Elektronenmikroskop oder durch Gelelektrophorese (Abb. 8) zeigte, daß die Komponenten I, II und III in den Fraktionen 17-18, 22 bzw. 23 angereichert waren. Durch Vergleich mit den Markern ergaben sich für die drei Komponenten die Sedimentationskonstanten von 22-23 S, 17 S bzw. 16 S (Abb. 9). Die Wiederholung des Experimentes mit einer Mischung aus HPV 1, 2 und 3 DNS ergab auch hinsichtlich dieses Parameters keinen Unterschied zwischen HPV 1, 2 und 3.

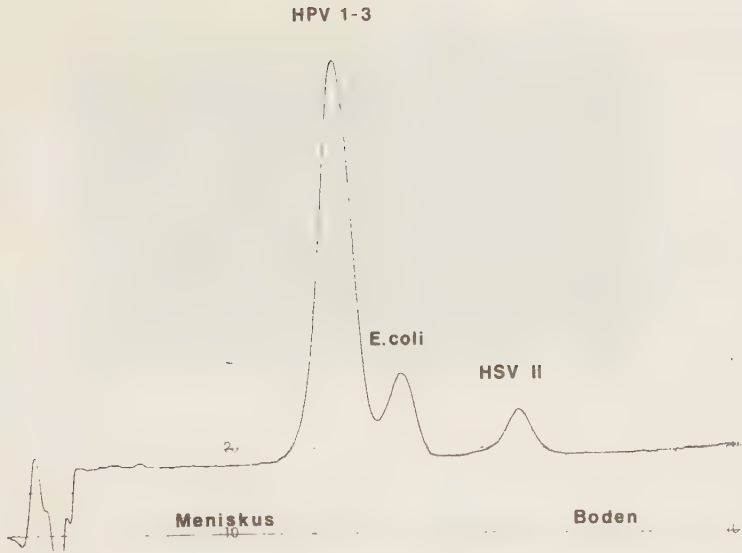
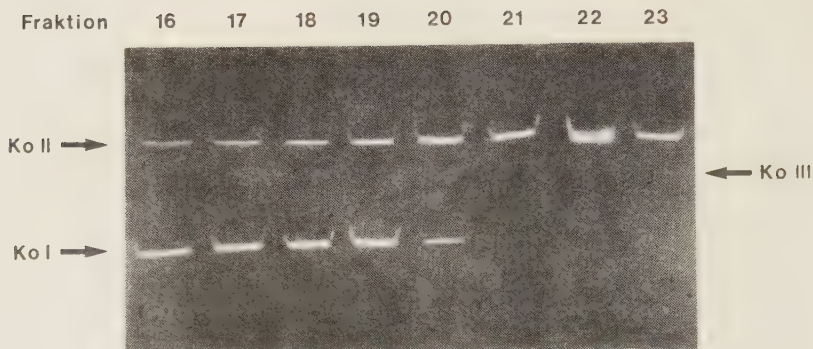


Abb. 7

Bandungsverhalten von HPV 1, 2 und 3 DNS (je 1 μg) im CsCl -Gradienten, verglichen mit der DNS von Escherichia coli K12 bzw. von Herpes simplex Typ II (je 0.5 μg). Die Kurve gibt die Extinktion bei 260 nm längs des CsCl -Gradienten an. Sie wurde nach Ausbildung des Dichtegradienten während des Laufes durch die in der analytischen Ultrazentrifuge eingebaute Photoeinrichtung als Differenz zu einer Referenzzelle ohne DNS aufgezeichnet.

Abb. 8

Analyse der HPV 1 DNS aus den Fraktionen 16-23 durch Gelelektrophorese (1% Agarose) nach Trennung der Komponenten I, II und III durch Sedimentation in CsCl . Den auftretenden Banden waren nach Elution der DNS aus der Agarose durch Zentrifugation im KJ-Gr-



dienten (Blin et al., 1975) und anschließender Darstellung im Elektronenmikroskop die drei Komponenten zugeordnet worden. Das Maximum der einzelnen Komponenten wurde aufgrund des Mengenverhältnisses der Banden innerhalb einer Fraktion bestimmt und anhand von elektronenmikroskopischen Präparaten, die parallel angefertigt wurden, bestätigt.

3.2.3. Bestimmung des Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von HPV DNS wurde die Moleküllänge von HPV 1 im Elektronenmikroskop gemessen. Als interner Standard diente die DNS des Bakteriophagen Lambda mit einem Molekulargewicht von 30.8×10^6 d (Davidson und Szybalski, 1971). Die durchschnittliche Länge von HPV 1 DNS beträgt $17.78 \pm 0.48\%$ des Lambda Genoms (Abb. 10); dieser Wert entspricht einem Molekulargewicht von 4.86×10^6 d (Standardabweichung: 3.03%). Die DNS von HPV 2, 3 oder 4 ist hinsichtlich ihrer Länge nicht von HPV 1 DNS zu unterscheiden: äquimolare Mischungen von HPV 1

mit HPV 2, 3 oder 4 DNS ergaben bei jeweils 50 ausgemessenen Molekülen homogene Längenverteilungen mit Standardabweichungen zwischen 2.47 und 2.83%.

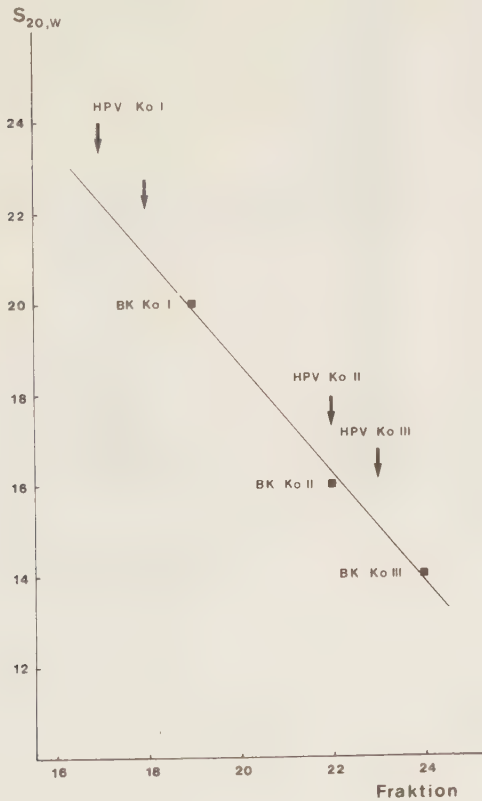


Abb. 9

Bestimmung der Sedimentationskonstanten der Komponenten I, II und III von HPV DNS anhand der Position der drei Komponenten von BK DNS mit den Sedimentationskonstanten ($S_{20,w}$) von 20 S, 16 S und 14 S (Seehafer et al., 1975).



Abb. 10

Längenverteilung der HPV DNS. Es wurden 50 Moleküle vermessen, und ihre Länge relativ zur Lambda DNS aufgetragen.

3.2.4. Kartierung der HPV 1, 2 und 3 Genome mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Zur Charakterisierung der HPV DNS wurden zunächst Anzahl und Molekulargewichte der Fragmente nach Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen bestimmt. Anschließend wurden die Spaltstellen der einzelnen Enzyme auf dem Genom einander zugeordnet.

3.2.4.1. Spaltung der HPV DNS mit jeweils einem Enzym

Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden mit gereinigter Komponente I von HPV 1, 2 oder 3 durchgeführt. HPV 3 zeigte mit allen untersuchten Enzymen identische Spaltungsmuster wie HPV 1 mit Ausnahme des geringen Unterschiedes im Hae III F Fragment (Abb. 6). Abb. 11 zeigt die Auftrennung der DNS Bruchstücke in der Gelelektrophorese der HPV 1 und 2 Genome mit den Restriktionsendonukleasen von *Escherichia coli* (Eco RI), *Bacillus amyloliquefaciens* (Bam HI), *Haemophilus influenzae* (Hind II, Hind III), *Haemophilus parainfluenzae* (Hpa II) und *Haemophilus aegyptius* (Hae III). Eco RI und Hind II haben auf den HPV 1 (3) und 2 Genomen die gleiche Anzahl von Spaltstellen (Abb. 11b, c). Die Molekulargewichte der erhaltenen Fragmente sind nach Auswertung in der Agarose Gelelektrophorese identisch; die genauere Analyse in Polyacrylamidgelen nach Doppelspaltung (s. 3.2.4.2.7.) ergab jedoch eine geringe Verschiebung einer Eco RI Spaltstelle auf der HPV 2 DNS im Vergleich zu HPV 1 (3).

HPV 2 hat für die Enzyme Bam HI, Hind III und Hpa II eine zusätzliche Spaltstelle verglichen mit HPV 1 oder 3 (Abb. 11a, d, e und Abb. 15). Ein Teil der DNS Moleküle erwies sich als partiell resistent gegen Hpa II (Favre et al., 1975b), da auch nach Inkubation mit der dreifachen Enzymmenge keine vollständige Spaltung des Genoms zu erreichen war. Der relative Anteil der ungespaltenen Moleküle war bei vier getesteten HPV 1 Präparationen identisch, unabhängig davon, ob Komponente I oder II zur Spaltung eingesetzt wurde.

Hae III spaltet die HPV 1 DNS 15 mal, HPV 2 besitzt nur 14 Spaltstellen. Abb. 11f zeigt, daß die unterste Bande bei HPV 1 und HPV 2, die einem Molekulargewicht von $0.016 - 0.018 \times 10^6$ d entspricht, gegenüber dem Fragment K mit einem Molekulargewicht von 0.04×10^6 d, also mit etwa der dreifachen Länge, eine etwas stärkere Fluoreszenz nach Färbung mit Äthidiumbromid aufweist. Daraus wurde geschlossen, daß dieses DNS Stück in vierfacher Molarität, verglichen mit den übrigen Fragmenten, vorliegen müsse, d.h., daß vier Fragmente mit (nahezu) demselben Molekulargewicht vorhanden sein sollten (s. Tabelle 3b).

Für die Enzyme Sal I von *Streptomyces albus* und Sma I von *Serratia marcescens* befinden sich keine Spaltstellen auf den HPV 1, 2 und 3 Genomen.

In Tabelle 3a, b wurden die Anzahl der Spaltstellen und die Molekulargewichte der resultierenden Fragmente zusammengefaßt.



Abb. 11

Auftrennung der DNS von HPV 1 und HPV 2 nach Spaltung mit verschie-

denen Restriktionsendonukleasen. Die Fragmente sind nach ihrer Größe alphabetisch bezeichnet (s. 2.23. und Tabelle 3b). Die HPV 3 DNS zeigte dieselben Ergebnisse wie die HPV 1 DNS.

- a. Spaltung mit Bam HI, Trennung in 1%iger Agarose
- b. Spaltung mit Eco RI, - " - ; zum Unterschied zwischen A1 und A2 bzw. B1 und B2 s. 3.2.4.2.7.
- c. Spaltung mit Hind II, Trennung in 1%iger Agarose
- d. Spaltung mit Hind III, - " - ; zum Unterschied zwischen A1 und A2 bzw. C1 und C2 s. 3.2.4.2.6., das Fragment B2b ist in Abb. 15 dargestellt.
- e. Spaltung mit Hpa II, Trennung in 1%iger Agarose; ein großer Teil der Moleküle wurde unvollständig gespalten, dadurch ließ sich die Anordnung der einzelnen Fragmente bestimmen (Abb. 20). Zum Unterschied zwischen C1 und C2 s. 3.2.4.2.8.
- f. Spaltung mit Hae III, Trennung in einem linearen Gradienten von 2-8% Polyacrylamid

Tabelle 3a

Anzahl der nach Spaltung der DNS von HPV 1, 2, 3 und 4 mit den verschiedenen Restriktionsenzymen (Abb. 11) erhaltenen Fragmente. Da es sich bei der DNS der menschlichen Papillomviren um zirkuläre Moleküle handelt (s. Abb. 3), ist die Zahl der beobachteten Fragmente identisch mit der Anzahl der Spaltstellen eines bestimm-

Getestetes Enzym	HPV 1	HPV 2	HPV 3	HPV 4
Ram HI	1	2	1	n.u.
Eco RI	2	2	2	n.u.
Hind II	3	3	3	n.u.
Hind III	3	4	3	n.u.
Hpa II	4	5	4	n.u.
Hae III	15	14	15 (16?) ⁺	6
Sal I	0	0	0	n.u.
Sma I	0	0	0	n.u.

ten Enzyms.

⁺: s. Abb. 20 bzw. Diskussion

3.2.4.2. Spaltung mit zwei Enzymen

Um die Lage der Spaltstellen der verschiedenen Enzyme zu bestimmen, wurde die HPV DNS mit jeweils zwei Nukleasen gleichzeitig gespalten und mit den durch Einzelspaltung erhalten Fragmenten verglichen.

Bei den unter 3.2.4.2.1 bis 3.2.4.2.3. beschriebenen Experimenten wird noch nicht auf den Unterschied zwischen HPV 1 und HPV 2 eingegangen.

Enzym	HPV 1		HPV 2		HPV 3		HPV 4	
	MG X 10 ⁻⁶ Bez.		MG X 10 ⁻⁶ Bez.		MG X 10 ⁻⁶ Bez.		MG X 10 ⁻⁶ Bez.	
Bam HI	4.8	A1	4.4	A2	4.8	A1	n.u.	
	-		0.45	B2	-			
Eco RI	4.05	A1	4.10	A2	4.05	A1	n.u.	
	0.63	B1	0.60	B2	0.63	B1		
Hind II	2.25	A1	2.25	A1	2.25	A1	n.u.	
	1.80	B1	1.80	B1	1.80	B1		
	0.78	C1	0.78	C1	0.78	C1		
Hind III	3.75	A1	3.75	A2	3.75	A1	n.u.	
	0.90	B1	0.85	B2a	0.90	B1		
	-		0.07	B2b	-			
	0.23	C1	0.23	C2	0.23	C1		
Hpa II	2.40	A1	1.55	A2a	2.40	A1	n.u.	
	-		0.82	A2b	-			
	1.90	B1	1.90	B1	1.90	B1		
	0.39	C1	0.39	C2	0.39	C1		
	0.13	D1	0.13	D1	0.13	D1		
Hae III	1.70	A1	1.75	A2	1.70	A1	2.70	A4
	0.90	B1	1.15	B2	0.90	B1	0.97	B4
	0.50	C1	0.50	C1	0.50	C1	0.42	C4
	0.36	D1	0.36	D2	0.36	D1	0.34	D4
	0.36	E1	0.24	E2a	0.36	E1	0.32	E4
	-		0.19	E2b	-		-	
	0.32	F1	-		0.31	F3	0.09	F4
	0.29	G1	0.29	G1	0.29	G1	-	
	0.21	H1	0.21	H1	0.21	H1	-	
	0.15	I1	0.15	I1	0.15	I1	-	
	0.06	J1	-		0.06	J1	-	
	0.04	K1	0.04	K1	n.u.		-	
	0.02	L1	0.02	L1	n.u.		-	
	0.02	M1	0.02	M1	n.u.		-	
	0.02	N1	0.02	N1	n.u.		-	
	0.02	O1	0.02	O1	n.u.		-	

Tabelle 3b

Molekulargewichte und Bezeichnung der nach Spaltung mit den ein-

zelnen Restriktionsenzymen erhaltenen Fragmente von HPV 1, 2, 3 und 4.

3.2.4.2.1. Eco RI + Hind II

Das Fragment Hind II B bleibt nach Spaltung mit Eco RI erhalten; Hind II A wird um nahezu die ganze Länge des Eco RI B Fragmentes verkürzt, Hind II C und Eco RI B sind etwas kürzer als nach Einzelspaltung. Daraus folgt, daß eine Eco RI Spaltstelle in Hind II A liegt, die zweite in Hind II C, dicht neben der Hind II Spaltstelle (Abb. 12).

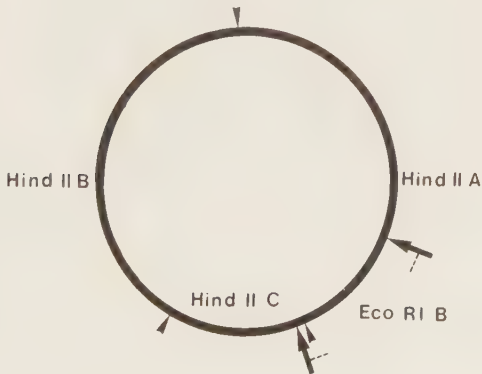


Abb. 12

Lokalisierung der Spaltstellen von Eco RI und Hind II auf dem HPV Genom

- ➡ : Eco RI Spaltstellen
- : Hind II Spaltstellen

3.2.4.2.2. Eco RI + Hind III

Hind III B und C bleiben nach Spaltung mit Eco RI unverändert, während Hind III A zweimal gespalten wird. Eines der resultierenden Fragmente ist Eco RI B. Beide Eco RI Spaltstellen liegen also in Hind III A. Abb. 13 zeigt die aufgrund dieser Ergebnisse möglichen beiden Anordnungen der Eco RI und Hind III Spaltstellen.

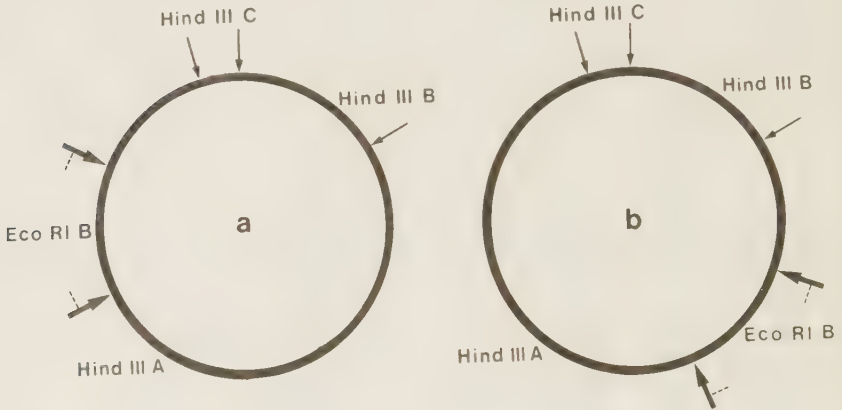


Abb. 13

Die aufgrund der Doppelspaltung von HPV DNS möglichen beiden Anordnungen der Eco RI Spaltstellen relativ zu Hind III

- ➡ : Eco RI Spaltstellen
- ➡ : Hind III Spaltstellen

3.2.4.2.3. Hind II + Hind III

Hind III C wird durch Hind II gespalten, Hind II C bleibt unverändert. Somit ist die Lage der Hind II und Hind III Spaltstellen eindeutig bestimmt (Abb. 14). Aufgrund dieser Lokalisation erweist sich Möglichkeit b in Abb. 13 als richtig.

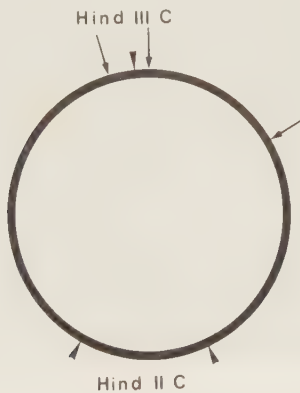


Abb. 14

Anordnung der Hind II und Hind III Spaltstellen auf dem HPV Genom

- : Hind II Spaltstellen
→ : Hind III Spaltstellen

3.2.4.2.4. Bam HI + Hind III

Bam HI spaltet das Hind III C Fragment. Das resultierende Bruchstück ist um etwa 0.02×10^6 d kürzer als Hind III C (Abb. 15). Die zusätzliche Bam HI Spaltstelle im HPV 2 Genom liegt in Hind III A (s. Abb. 20). Das ergibt - zumindest für HPV 2 - eine eindeutige Zuordnung der Spaltstellen. Die Möglichkeit, daß die einzige Bam HI Spaltstelle in der HPV 1 und HPV 3 DNS am anderen Ende des Hind III C Fragmentes liegen könnte, wurde durch Doppelspaltung mit Bam HI + Hind II bzw. Bam HI + Eco RI ausgeschlossen.

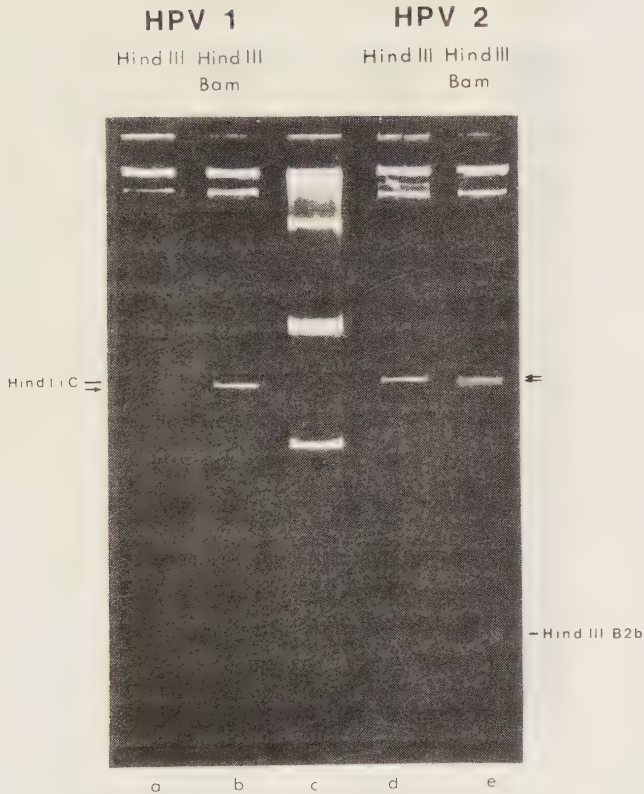
Aus den bisherigen Ergebnissen ließ sich die zusätzliche Hind III Spaltstelle im HPV 2 Genom (Fragment B2b) nicht lokalisieren. Ihre Zuordnung ergab sich aus der Doppelspaltung mit Hae III (s. 3.2.4.2.6.).

3.2.4.2.5. Bam HI + Hae III

Bam HI spaltet das Hae III C Fragment (Abb. 16); die bei HPV 2 zusätzlich vorhandene Bam HI Spaltstelle muß in einem der kurzen Fragmente (J-O) liegen (Abb. 11f), da die in der 4%igen Polyacrylamid Gelelektrophorese darstellbaren Fragmente A-I gegenüber der Einzelspaltung unverändert sind.

Abb. 15

Auftrennung der DNS von HPV 1 bzw. HPV 2 nach Doppelspaltung mit Hind III + Bam HI in einem 4%igen Polyacrylamidgel, verglichen



mit den durch Einzelspaltung mit Hind III erhaltenen Fragmenten.

- a. HPV 1 gespalten mit Hind III b. HPV 1 gespalten mit Hind III
+ Bam HI c. PM2 DNS gespalten mit Hind III (Längenmarker)
- d. HPV 2 gespalten mit Hind III e. HPV 2 gespalten mit Hind III
+ Bam HI

Die nach Doppelspaltung mit Bam HI auftretenden Banden sind mit Pfeilen markiert. Das Molekulargewicht des Hind III B2b Fragmentes wurde aufgrund dieses Experimentes als 0.07×10^6 d bestimmt.

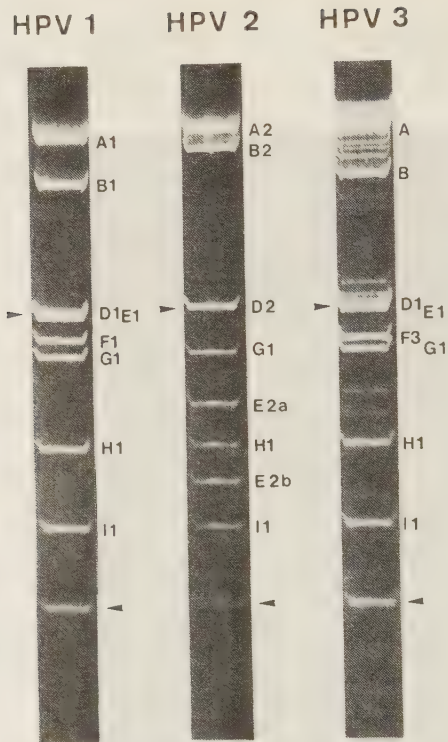


Abb. 16

Trennung der DNS nach HPV 1, 2 und 3 nach Doppelspaltung mit Bam HI + Hae III in einem 4%igen Polyacrylamidgel. Die Großbuchstaben bezeichnen die Hae III Fragmente, die zusätzlich auftretenden Banden sind mit Pfeilen markiert. Die bei HPV 3 sichtbaren Banden zwischen G1 und H1 stellen die unvollständig gespaltenen Fragmente H1 + K1 bzw. H1 + N1 dar.

3.2.4.2.6. Hind III + Hae III

Hae III C wird von Hind III zweimal gespalten, d.h., Hind III C liegt innerhalb von Hae III C. Wie aus dem Abstand zum Hae III H1

Fragment zu ersehen ist (Abb. 17a), unterscheiden sich die Hind III C Fragmente von HPV 1 (3) und HPV 2 um einen geringen Betrag. Hae III B in HPV 1 und 3 wird von Hind III geschnitten, das entsprechende Fragment von HPV 2 ist um den Betrag von Hind III B2b kürzer (Abb. 17b). Dies beweist, daß die zusätzliche Hind III Spaltstelle an das Hind III A Fragment angrenzt. Das bei HPV 2 zusätzlich auftretende Fragment zwischen A2 und D2 (Abb. 17a) ergibt sich als Summe aus dem F Fragment von HPV 1 und dem Stück bis zur Hind III Spaltstelle. Daraus folgt die Reihenfolge Hae III C - B - F in HPV 1, ferner erklären sich das fehlende F Fragment und das im Vergleich zu Hae III B1 größere B Fragment von HPV 2 aus der fehlenden Spaltstelle zwischen Hae III B und Hae III F.

3.2.4.2.7. Hind II + Hae III, Eco RI + Hae III

Hind II spaltet das Hae III C Fragment, die beiden übrigen Spaltstellen liegen in Hae III A. Eco RI spaltet ebenfalls zweimal in Hae III A. Aus den resultierenden Fragmenten wurde gefolgert, daß Hae III A1 dem Hae III F1 Fragment (bzw. Hae III A2 dem Hae III B2 Fragment) benachbart ist (s. Abb. 20). Die Doppelspaltung mit Hae III + Hind II ergab ferner, daß das im Vergleich zu HPV 1 größere Hae III A Fragment von HPV 2 auf einer Verschiebung der Spaltstelle zwischen Hae III A und Hae III B (nicht zwischen A und I) beruhen müsse, da das entstehende HPV 2 Fragment mit einem Molekulargewicht von 0.65×10^6 d um 0.05×10^6 d länger war als das entsprechende Stück bei HPV 1 (Abb. 18). Dieser Unterschied

trat auch nach Doppelspaltung mit Hpa II auf (s. 3.2.4.2.8.), er wurde jedoch nicht nach Doppelspaltung mit Eco RI beobachtet. Daraus wurde geschlossen, daß die sich entsprechenden Spaltstellen von Eco RI bei HPV 1 und HPV 2 um etwa denselben Betrag von 0.05×10^6 d gegeneinander versetzt sein müssen (Abb. 20). Diese geringe Längendifferenz war in der Agarose Gelelektrophorese nicht aufgefallen (Abb. 11b).

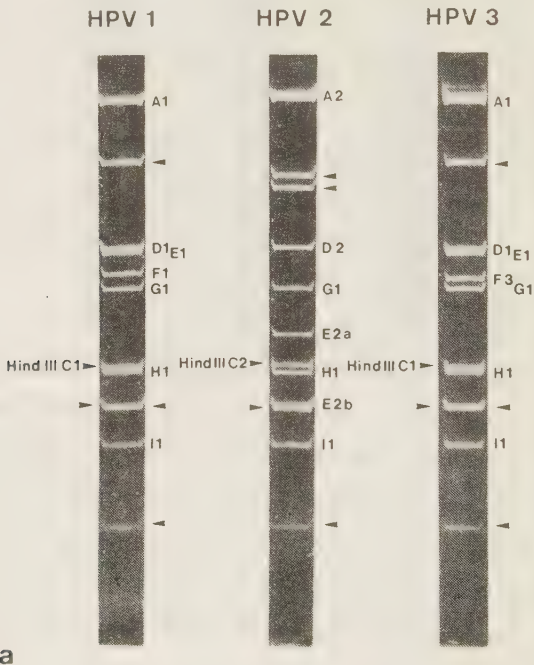
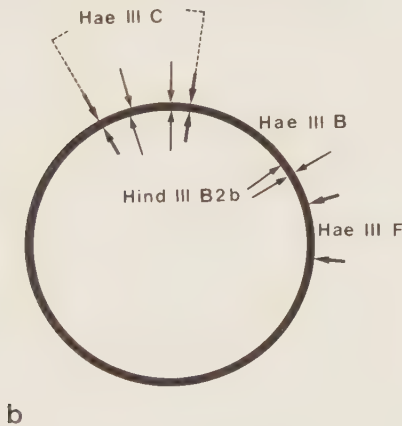


Abb. 17

Doppelspaltung von HPV 1, 2 und 3 DNS mit Hind III + Hae III
a. Trennung der Fragmente in einem 4%igen Polyacryamidgel. Die

Großbuchstaben kennzeichnen die Hae III Fragmente, die aufgrund der Doppelspaltung auftretenden Fragmente sind durch Pfeile markiert.



b. Darstellung der anhand dieses Experimentes zu lokalisierenden Spaltstellen. Die von außen auf den Kreis deutenden Pfeile markieren die Spaltstellen auf dem HPV 1 und HPV 3 Genom, die Pfeile im Inneren des Kreises symbolisieren die Spaltstellen bei HPV 2. $\longrightarrow$: Hind III Spaltstellen $\longrightarrow$: Hae III Spaltstellen

3.2.4.2.8. Hpa II + Hae III

Anhand der definierten Hae III Fragmente C - B - (F) - A konnten die Hpa II Spaltstellen bei HPV 1 und 3 zugeordnet werden. Die Position der zusätzlich auftretenden Spaltstelle bei HPV 2 ging aus der Doppelspaltung mit Hind III hervor. Hpa II spaltet das

3.2.4.3. Unvollständige Spaltung

Die Reihenfolge der Hae III Fragmente D, E, G, H, I, J, K, L, M, N und O konnte nicht durch Doppelspaltung bestimmt werden, da kein anderes der untersuchten Enzyme in dieser Region des Genoms schneidet. Lediglich aus der Kombination von Hae III und Hpa II ging hervor, daß die zusätzliche Hpa II Spaltstelle in der HPV 2 DNS im Hae III E2b Fragment liegt (Abb. 20).

Unvollständige Spaltung mit der Hälfte der sonst eingesetzten Enzymmenge ergibt alle möglichen Kombinationen von Bruchstücken als Summe von zwei oder mehreren Einzelfragmenten, deren Anordnung sich dann aus den Molekulargewichten der partiell gespaltenen Fragmente ermitteln läßt. Abb. 19 zeigt die Analyse der Hae III Fragmente unvollständig gespaltenener HPV 1 und HPV 2 DNS in der Elektrophorese durch 1%iges Agarosegel. In Tabelle 4 sind die sich aus den Molekulargewichten ergebenden Anordnungen der Einzelfragmente aufgeführt.

Die Fragmente K-O wurden durch Analyse der partiell gespaltenen DNS im 4%igen Polyacrylamidgel zugeordnet (s.z.B.: Abb. 16).

Ihre Positionen müßten aber noch mit Hilfe von weiteren Enzymen überprüft werden, die in dieser Region des Genoms spalten.

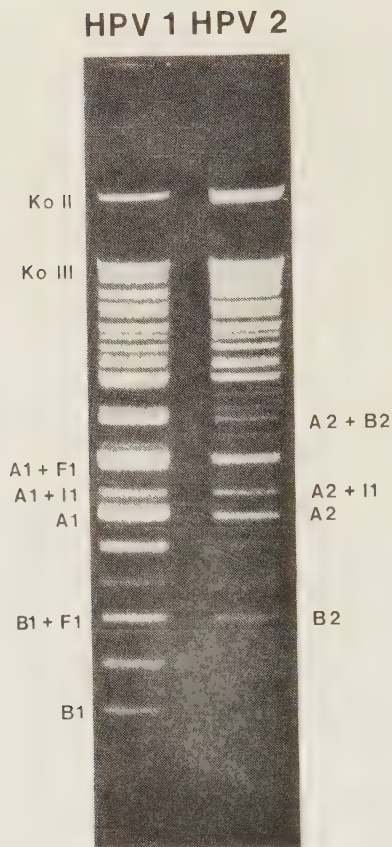


Abb. 19

Auftrennung der HPV 1 und HPV 2 DNS in einem 1%igen Agarosegel nach unvollständiger Spaltung mit Hae III. Es wurden nur die Banden gekennzeichnet, die vollständig gespaltene Fragmente repräsentieren oder die sich als Summe zweier Fragmente ergeben.

Molekulargewichte der Fragmente $\times 10^{-6}$		Anordnung der Fragmente	
HPV 1, HPV 3	HPV 2	HPV 1, HPV 3	HPV 2
0.67	0.67	G1 D1	G1 D2
0.80	0.80	D1 J1 E1	D2 E2b E2a
1.05	1.05	I1 H1 G1 D1	I1 H1 G1 D2
1.85	1.85	A1 I1	A2 I1
2.05	-	F1,3 A1	
2.2	-	D1 J1 E1 C1 B1	
-	2.5		D2 E2b E2a C1 B2

Tabelle 4

Anordnung der Hae III Fragmente A-J von HPV 1, 2 und 3. PVS durch Analyse unvollständige, geschnittener Bruchstücke (Abb. 19). Die Reihenfolge der Fragmente D2b - E2a - C wurde durch Doppelspaltung mit Hae III + Hpa II bestimmt.

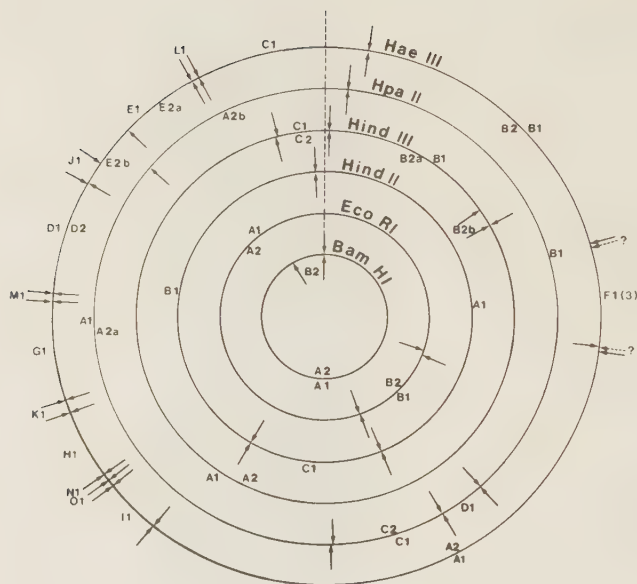


Abb. 20

Lage der Spaltstellen der Restriktionsendonukleasen Bam HI, Eco RI, Hind II, Hind III, Hpa II und Hae III auf dem HPV Genom. Jeder Kreis symbolisiert die DNS mit den Spaltstellen eines Enzyms. Die von außen an die Kreise deutenden Pfeile markieren die Spaltstellen im HPV 1 oder HPV 3 Genom, die Pfeile von der Innenseite repräsentieren die Spaltstellen in HPV 2.

Die gestrichelten Pfeile im Hae III F Fragment deuten die mögliche zusätzliche Spaltstelle von Hae III im HPV 3 Genom an (s. Diskussion).

3.2.5. Test auf nicht homologe Abschnitte im HPV 1 und HPV 2 Genom nach Heteroduplex-Bildung

Da sich zwischen HPV 1 und HPV 2 aufgrund der unter 3.2.4. beschriebenen Experimente erhebliche Unterschiede gezeigt hatten, sollte geprüft werden, ob in den beiden Genomen größere nicht homologe Bereiche existieren, die sich nach Hybridisierung von HPV 1 und HPV 2 DNS elektronenmikroskopisch als ungepaarte Bereiche (Loops) in sonst doppelsträngigen Hybridmolekülen (Heteroduplices) darstellen sollten.

Um lineare Moleküle mit definiertem Anfang und Ende zu erhalten, wurde die DNS von HPV 1 und HPV 2 (jeweils Ko I) mit der Eco RI Endonuklease verdaut, die in beiden Genomen an nahezu denselben Stellen spaltet (Abb. 20). Nach Analyse der hybridisierten Eco RI Fragmente von HPV 1 und HPV 2 ließen sich heterologe Abschnitte in diesen Genomen nicht nachweisen. Es zeigten sich aber - neben vollständig gepaarten Fragmenten - auch nicht renaturierte Moleküle. Dabei waren etwa 90% aller einzelsträngigen Eco RI A Fragmente in sich selbst zurückgefaltet (Abb. 21). Die aufgrund der Basenpaarung auftretende Schleife ist in nahezu allen Fällen etwa gleichweit von den Enden des Moleküls entfernt (Abb. 22). Daraus läßt sich schließen, daß eine bestimmte Basensequenz an einer zweiten Stelle des Genoms in umgekehrter Reihenfolge vorhanden ist (repetitive Inversion).

Die Darstellung von mit sich selbst hybridisierter HPV 1 oder HPV 2 DNS in getrennten Präparationen ergab, daß solche repetitive Sequenzen in beiden Genomarten auftreten.

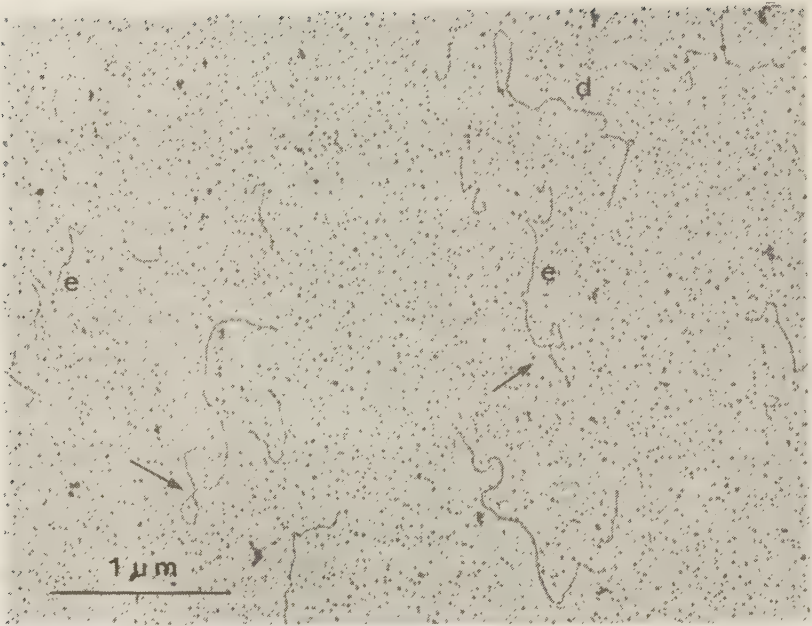


Abb.21

Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV 1 + HPV 2 DNS nach Spaltung mit Eco RI. Die Moleküle wurden alkalisch denaturiert, für 90 min in 50% Formamid bei Zimmertemperatur hybridisiert und anschließend mit der Spreitungstechnik (s. 2.16.2.2.) präpariert. Die Abbildung zeigt doppelsträngige (d) und einzelsträngige (e) Moleküle. Die durch Rückfaltung einzelsträngiger Eco RI A Fragmente entstandenen Schleifen sind mit Pfeilen markiert.

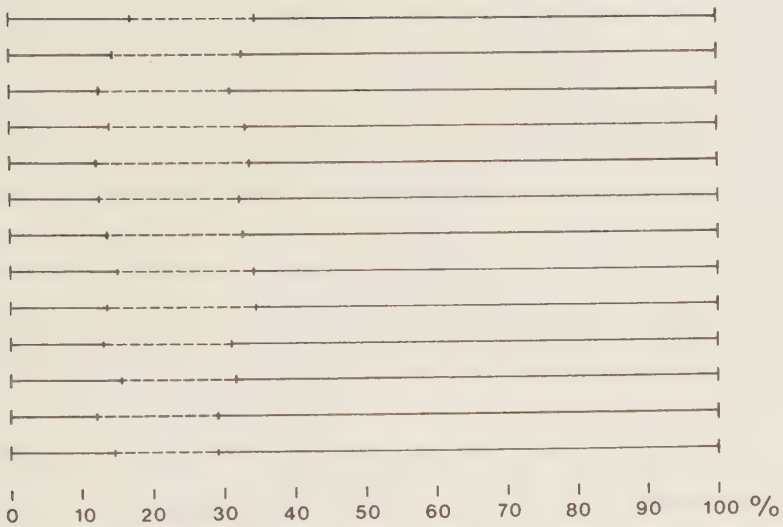


Abb. 22

Schematische Darstellung von 13 mit sich selbst gepaarten einzelsträngigen Eco RI A Fragmenten von HPV 1 (2). Die ausgezogenen Linien symbolisieren die Strecken von den Molekülenden bis zur Schleife, die gestrichelte Linie markiert die Länge der Schleife. Die Größen wurden auf die Gesamtlänge des jeweiligen Moleküls bezogen. Die repetitiven Sequenzen (Grenzen zwischen ausgezogener und gestrichelter Linie) sind durchschnittlich 14 bzw. 32% vom einen Ende des Eco RI A Fragmentes entfernt.

4. Diskussion

Während etwa seit den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts in den dermatologischen Lehrbüchern die Homogenität des menschlichen Warzenvirus betont wird (Nasemann, 1974), scheinen jüngere Arbeiten auf die Existenz unterschiedlicher Papillomviren des Menschen (HPV) hinzudeuten (Almeida et al., 1969; Pass und Maizel, 1973; zur Hausen et al., 1974; zur Hausen et al., 1976). Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Viren aus jeweils einer Hautwarze (*Verruca vulgaris* bzw. *Verruca plantaris*) - d.h., jeweils aus einem Virusklon - zu reinigen und ihre Desoxyribonukleinsäuren (DNS) hinsichtlich der Basensequenz sowie einiger physikalischer Parameter miteinander zu vergleichen. Dazu wurden die wässrigen Warzenextrakte im Elektronenmikroskop auf Viruspartikel untersucht. Nur bei Virus-positiven Extrakten wurde eine Virusreinigung mit anschließender DNS Extraktion durchgeführt. Insgesamt enthielten etwa 20% aller untersuchten Warzen das Virus in ausreichender Menge, um damit die entsprechenden Experimente durchführen zu können.

Nach Spaltung der DNS aus verschiedenen Isolaten mit dem Restriktionsenzym von *Haemophilus aegyptius* Hae III ließen sich vier menschliche Papillomviren (HPV 1, 2, 3 und 4) identifizieren. Dabei zeigen HPV 1 (41 Isolate) und HPV 2 (3 Isolate) und HPV 3 (2 Isolate) große Ähnlichkeit hinsichtlich ihres Bandenmusters nach der Spaltung, während HPV 4 (2 Isolate) sich eindeutig von diesen unterscheidet (Abb. 6). Durch Hybridisierung der viralen

DNS ließ sich die nahe Verwandtschaft zwischen HPV 1, 2 und 3 bestätigen. Demgegenüber muß das HPV 4 Virus, das zwar morphologisch (Abb. 1) sowie hinsichtlich des Molekulargewichtes seiner DNS mit HPV 1-3 identisch ist, aufgrund der fehlenden Basenhomologie mit HPV 1 als völlig unterschiedliches menschliches Papillomvirus bezeichnet werden.

Die weitere Charakterisierung der DNS war nur bei HPV 1, 2 und 3 möglich, da die Virusaussaat von HPV 4 bei beiden Isolaten äußerst gering war. Die DNS von HPV 1, 2 und 3 erwies sich bezüglich des Molekulargewichtes, der Dichte und der Sedimentationskonstanten als identisch. Die empfindlichere Methode der Analyse mit Restriktionsendonukleasen erbrachte jedoch mit nahezu allen verwendeten Enzymen Unterschiede zwischen HPV 1 und 2: während etwa 75% aller identifizierten Spaltstellen im HPV 1 und HPV 2 Genom identisch sind, existieren zusätzliche Spaltstellen von Bam HI, Hind III, Hpa II und Hae III bei HPV 1 oder HPV 2 sowie im Vergleich zu HPV 1 leicht verschobene Spaltstellen von Eco RI, Hind III, Hpa II und Hae III in HPV 2, die möglicherweise auf die Inversion kurzer DNS Abschnitte zurückzuführen sind. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen dem HPV 1 und HPV 2 Genom jedoch zu gering, als daß sie sich als einzelsträngige Stücke (Loops) in Hybridmolekülen darstellen ließen. Auch die durch intramolekulare Rückfaltung einzelsträngiger Moleküle nachweisbare Repetition einer bestimmten Basensequenz - nämlich 14 bzw. 32% vom einen Ende des Eco RI A Fragmentes entfernt - tritt in beiden Genomen auf. Dabei muß allerdings noch durch die Analyse einzel-

strängiger und mit sich selbst hybridisierter Bam HI oder Hind II Fragmente geklärt werden, an welchem Ende des Eco RI A Fragmentes die repetitiven Sequenzen lokalisiert sind.

HPV 3 unterscheidet sich von HPV 1 nur durch das etwas kürzere Hae III F Fragment. Dabei wurde nicht geklärt, ob das HPV 3 Genom eine kleine Deletion trägt, oder ob Hae III hier eine zusätzliche Spaltstelle nahe dem Fragment Hae III A oder Hae III B besitzt (Abb, 20). Trotz dieses nur sehr geringen Unterschiedes dürfte es sich bei HPV 3 dennoch um eine biologisch signifikante Virusvariante handeln, da dieses Virus aus den Warzen zweier Patienten isoliert werden konnte.

In Tabelle 5 sind die Möglichkeiten der Differenzierung zwischen HPV 1, 2, 3 und 4 zusammengefaßt.

Die meisten Spaltstellen der einzelnen Restriktionsenzyme auf dem HPV Genom konnten mit Hilfe von Doppelspaltungen eindeutig lokalisiert werden. Die Anordnung der Hae III Fragmente D, E, G und H-O war jedoch nur durch unvollständige Spaltung anhand der Summe zweier oder mehrerer benachbarter Fragmente möglich und sollte deshalb durch Behandlung mit weiteren Enzymen überprüft werden, die in dieser Region des Genoms spalten.

Die Kartierung der HPV 1 DNS mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI, Eco RI, Hind II, Hind III und Hpa II stimmt mit den Ergebnissen von Favre et al. (1975b, Favre, pers. Mitteilung) überein. Während von einer anderen Arbeitsgruppe mehr als 20 Spaltstellen mit dem Enzym Hae III berichtet werden (Lancaster und Meinke, 1976), ließen sich auch durch Analyse der gespaltenen DNS in einem 8%igen Polyacrylamidgel außer den 15 identifizierten

Fragmenten mit Molekulargewichten zwischen $1.7 \cdot 10^6$ und $0.02 \cdot 10^6$ d (s. Tabelle 3b) keine weiteren finden, obwohl - wie durch Extrapolation bestimmt wurde - noch Fragmente mit einem Molekulargewicht von $< 0.01 \cdot 10^6$ d nachweisbar gewesen wären. Möglicherweise sind die von Lancaster und Meinke zusätzlich beschriebenen Fragmente auf eine Heterogenität innerhalb der verwendeten DNS zurückzuführen.

Untersuchter Parameter	HPV 2	HPV 3	HPV 4
Spaltstellen von Bam HI	+	-	n.u.
" Eco RI	+	-	n.u.
" Hind II	-	-	n.u.
" Hind III	+	-	n.u.
" Hpa II	+	-	n.u.
" Hae III	+	+	+
" Sal I	-	-	n.u.
" Sma I	-	-	n.u.
DNS-cRNS Hybridisierung	-	-	+
Dichte in CsCl	-	-	n.u.
Sedimentationskonstanten	-	-	n.u.
Molekulargewicht	-	-	-
Loop-Bildung	-	n.u.	n.u.
Intramolekulare Rückfaltung	-	n.u.	n.u.

Tabelle 5

Möglichkeiten der Differenzierung von HPV 2, 3 und 4 gegenüber HPV 1
n.u.: nicht untersucht

Das HPV 1 Genom erweist sich als teilweise resistent gegenüber dem Enzym Hpa II: auch bei dreifachem Enzymüberschuß bleiben etwa 50% der Moleküle zwischen den Fragmenten A1 und B1 ungespalten (Abb. 20), während etwa 5% der DNS durch die Fragmente A1 + C1, B1 + D1 bzw. C1 + D1 repräsentiert wird. Durch zehnfachen Enzymüberschuß und 24stündige Inkubation wird die DNS in diesem Bereich vollständig gespalten, jedoch ist auch hier eine Resistenz bei 50% der Moleküle zwischen A1 und B1 zu beobachten (Favre, pers. Mitteilung). Diese Resistenz der Moleküle dürfte nicht auf eine genetische Heterogenität innerhalb der aus einer Warze gereinigten Viren zurückzuführen sein, da sich das Verhältnis der einzelnen Banden bei vier verschiedenen HPV 1 Isolaten als identisch erwies.

Die in dieser Arbeit bestimmten Werte für Molekulargewicht und Gehalt an Guanin + Cytosin der HPV DNS stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein (Crawford und Crawford, 1963; Favre et al., 1975b). Die Sedimentationskonstanten sind jedoch niedriger als die früher bestimmten Werte (Crawford und Crawford, 1963): 23-23 S, 17 S und 16 S für die Komponenten I, II und III gegenüber 28 S, 20 S und 18 S. Möglicherweise sind die von Crawford und Crawford ermittelten höheren Sedimentationskonstanten durch Proteinmoleküle bedingt, die nach der milden Detergensbehandlung (0.2% SDS, 10 min bei Zimmertemperatur), die in der zitierten Arbeit angewandt wurde, nicht vollständig entfernt werden konnten. Bei einem Vergleich von verschiedenen starken Detergensbehandlungen zeigte sich nämlich, daß nach einer viermi-

nütigen Inkubation mit 0.2% SDS bei 37°C noch etwa 10-20% der DNS Moleküle mit Protein assoziiert waren (Abb. 3c).

Die zusätzlich zu den hier beschriebenen Untersuchungen am Institut durchgeführten Analysen der viralen Proteine und der antigenen Eigenschaften von HPV 1, 2, 3 und 4 (Gissmann et al., im Druck) zeigen - ebenso wie die Vergleiche der DNS - eine nahe Verwandtschaft zwischen HPV 1-3, während sich HPV 4 deutlich von diesen unterscheidet. HPV 4, das nur zweimal durch Hae III Spaltung der DNS identifiziert werden konnte, ließ sich mit der Methode der Proteinanalyse in der SDS Gelelektrophorese, die wegen der im Vergleich zur DNS etwa zehnfach größeren Proteinmenge im Virion mit erheblich geringeren Partikelkonzentrationen auskommt, in zehn weiteren Fällen nachweisen. Demnach könnte HPV 4 ähnlich häufig sein wie HPV 1, wobei allerdings generell die in diesen Warzen vorliegende Viruskonzentration nur sehr gering ist. Es dürfte sich also bei diesem Virus im Vergleich zu HPV 1-3 um ein Agens mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften handeln. Es ist jedoch nicht bekannt, inwieweit sich die Histologie der von HPV 4 induzierten Warzen von HPV 1-3 haltigen Warzen unterscheidet.

HPV 4 Virus ist - ebensowenig wie HPV 1-3 - sehr wahrscheinlich nicht mit dem Virus der Condylomata acuminata oder der Larynxpapillome identisch, da weder HPV 1 noch HPV 4 cRNS mit der DNS aus diesen Papillomen hybridisierte. Diese Ergebnisse müßten aber noch mit Hilfe der empfindlicheren Methode der Reassoziationskinetik von DNS aus den zu untersuchenden Biopsien und vi-

raler DNS, die mit dem Kornberg Enzym durch Einbau von Tritiummarkierten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (Nonoyama und Pagano, 1973) oder durch Addition von ^{125}Jod an die Cytosinreste (Commerford, 1971) in vitro radioaktiv markiert wurde, überprüft werden. Die radioaktive Markierung der viralen DNS wäre auch geeignet, um aus Warzen mit sehr geringer Virusaussaat die DNS nach Spaltung mit Restriktionsenzymen und anschließender Autoradiographie der Gele zu charakterisieren und auf diese Weise zusätzlich auftretende menschliche Papillomviren identifizieren zu können, deren Existenz durch die oben genannten negativen Hybridisierungsergebnisse von HPV 1 und HPV 4 cRNS mit der DNS aus Condylomen, Larynxpapillomen und einigen der untersuchten Hautwarzen nahegelegt wird. Besonders die Charakterisierung des Virus der Condylomata acuminata und der Larynxpapillome wäre im Hinblick auf die gelegentliche maligne Entartung dieser Warzen in Plattenepithelkarzinome des Genitalbereiches bzw. des Kehlkopfes (zur Hausen, 1976; zur Hausen, in Vorbereitung) von besonderem Interesse.

5. Zusammenfassung

Zum Vergleich menschlicher Papillomviren (HPV) wurde die DNS der aus jeweils einer Hautwarze isolierten Partikel durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease von *Haemophilus aegyptius* (Hae III) charakterisiert. Jedes der 47 untersuchten Isolate ließ sich einem von vier menschlichen Papillomviren (HPV 1-4) zuordnen. HPV 1, 2 und 3 sind aufgrund des ähnlichen Basenmusters der DNS nach Spaltung mit Hae III sowie aufgrund der durch Nukleinsäurehybridisierung gezeigten Basenhomologie als nahe verwandte Viren zu betrachten, von denen sich HPV 4 erheblich unterscheidet.

Während die HPV 4 DNS wegen der sehr geringen Ausbeute nicht weiter charakterisiert werden konnte, wurden HPV 1, 2 und 3 anhand einiger physikalischer Parameter und durch Spaltung mit weiteren bakteriellen Restriktionsenzymen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Desoxyribonukleinsäuren von HPV 1, 2 und 3 hinsichtlich ihres Gehaltes an Guanin + Cytosin (41%), der Sedimentationskonstanten der Komponenten I, II und III (22-23 S, 17 S bzw. 16 S) sowie in ihrem Molekulargewicht (4.86×10^6 d) nicht zu unterscheiden waren. Die Spaltung mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Eco RI, Hind II, Hind III, Hpa II und Hae III ergab jedoch neben identischen DNS Fragmenten auch signifikante Unterschiede zwischen HPV 1 und HPV 2. Elektronenmikroskopisch konnten in den HPV 1 und HPV 2 Genomen anhand der Rückfaltung einzelsträngiger Moleküle repetitive Inversionen nachgewiesen werden. HPV 3 ließ sich nur in einem Fragment nach Spaltung mit Hae III

von HPV 1 unterscheiden. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Spaltstellen aller verwendeten Enzyme auf dem Genom von HPV 1, 2 und 3 lokalisiert.

6. Literaturangaben

- Almeida, J.D., J.D. Oriel and L.M. Stannard (1969):
Characterization of the virus found in human genital warts.
Microbios, 3, 225-232
- Baptist, J.M., C.R. Shaw and M. Mandel (1969): Zone electrophoresis
of enzymes in bacterial taxonomy.
J. Bact., 99, 180-191
- Blin, N., A.v. Gabain and H. Bujard (1975): Isolation of large
molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by
restriction enzymes.
FEBS Letters, 53, 84-86
- Bornkamm, G.W., H. Delius, B. Fleckenstein, F.-J. Werner and
C. Mulder (1976): Structure of herpesvirus saimiri genomes:
Arrangements of heavy and light sequences in the M-genome.
J. Virol. 19, 154-161
- Boyle, W.F., J.L. Riggs, L.S. Oshiro and E.H. Lenette (1973):
Electron microscopic identification of papova virus in laryngeal
papilloma.
Laryngoscope, 83, 1102-1108
- Bunting, H. (1953): Close-packed array of virus-like particles
within cells of human skin papilloma.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 84, 327-332

Burgess, R.R. (1969): A new method for the large scale purification of Escherichia coli deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase.

J. Biol. Chem., 244, 6160-6167

Ciuffo, G. (1907): Innesto positivo con filtrato di verruca volgare

Giorn. Ital. Mal. Venereol. 48, 12-17

Commerford, S.L. (1971): Iodination of nucleic acids in vitro. Biochemistry, 10, 1993-2000

Crawford, L.V. and E.M. Crawford (1963): A comparative study of polyoma and papilloma viruses.

Virology, 21, 258-263

Danna, K.J., G.H. Sack and D. Nathans (1973): Studies of simian virus 40 DNA VII. A cleavage map of the SV 40 genome.

J. Mol. Biol., 78, 363-376

Davidson, N. and W. Szybalski (1971) in: The Bacteriophage Lambda A.D. Hershey ed.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 45-82

Davis, R.W., M. Simon and N. Davidson (1971): Electron microscopy heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids.

in: Methods in Enzymology, 21, Nucleic Acids, Part D, L. Grossman and K. Moldave eds. Ac. Press, New York and London, 413-428

Dulbecco, R. and M. Vogt (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.

J. Exptl. Med. (Baltimore), 99, 167-182

Dunn, A.E.G. and M.M. Ogilvie (1968): Intranuclear virus particles in human genital wart tissue: Observations on the ultrastructure of the epidermal layer.

J. Ultrastr. Res., 22, 110-131

Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130, 432-437

Favre, M., F. Breitburd, F., O. Croissant and G. Orth (1975a): Structural polypeptides of rabbit, bovine and human papilloma viruses.

J. Virol., 15, 1239-1247

Favre, M., G. Orth, O. Croissant and M. Yaniv (1975b): Human papillomavirus DNA: Physical map.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4810-4814

Gardner, S.D., A.M. Field, D.V. Coleman and B. Hulme (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation.

Lancet, 1, 1253-1257

Gissmann, L. and H. zur Hausen (1976): Human papilloma virus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1310-1313

Gissmann, L., H. Pfister and H. zur Hausen (im Druck): Human papilloma viruses (HPV): Characterization of 4 different isolates
Virology

Goldschmidt, H. and A.M. Kligman (1958): Experimental inoculation of humans with ectodermotropic viruses.

J. Invest. Dermatol. 31, 175-182

Greene, P.J., M.C. Betlach, H.M. Goodman and H.W. Boyer (1974): The Eco RI restriction endonuclease
in: Methods in molecular biology series: DNA replication and biosynthesis Vol. 7. Marcel Dekker Inc., New York, 87-111

Hall, M.R., W. Meinke and D.A. Goldstein (1973): Nucleoprotein complexes containing replicating simian virus 40 DNA: Comparison with polyoma nucleoprotein complexes.

J. Virol., 12, 901-908

Lancaster, W.D. and W. Meinke (1976): Restriction endonuclease cleavage patterns of human papilloma viral DNA.

Abstract. The 76th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Atlantic City, New Jersey, 2.-7. Mai, 1976

Lang, D. and M. Mitani (1970): Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers.

Biopolymers, 9, 373-379

Ludwig, H. (1972): Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren.

Med. Microbiol. Immunol., 158, 227-236

Middleton, J.H., M.H. Edgell and C.A. Hutchinson III (1972): Specific fragments of ϕ X 174 deoxyribonucleic acid produced by a restriction enzyme from *Haemophilus aegyptius*, endonuclease Z. J. Virol., 10, 42-50

Murray, R.F., J. Hobbs and B. Payne (1971): Possible clonal origin of common warts (*Verruca vulgaris*). Nature (London), 232, 51-52

Nasemann, Th. (1974): Viruskrankheiten der Haut, der Schleimhäute und des Genitales. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Nathans, D. and H.O. Smith (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann. Rev. Biochem., 44, 273-293

Nonoyama, M. and J. Pagano (1973): Homology between Epstein-Barr virus DNA from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma by reassociation kinetics. Nature (London), 242, 44-47

Old, R., K. Murray and G. Roizes (1975): Recognition sequence of restriction endonuclease III from *Haemophilus influenzae*. J. Mol. Biol., 92, 331-339

Pass, F. and J.V. Maizel (1973): Wart-associated antigens. II: Human immunity to viral structural proteins. J. Invest. Dermatol., 60, 307-311

Radloff, R.W., W. Bauer and J. Vinograd (1967): A dye-boyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HELA cells.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1514-1521

Robinson, A.J., H.B. Younghusband and A.J.D. Bellett (1973):

A circular DNA-protein complex from adenoviruses.

Virology, 56, 54-69

Robinson, R.A. and R.H. Stokes (1955): Electrolyte solutions.

Acad. Press, New York

Rowson, K.E.K. and B.W.J. Mahy (1967): Human papova (wart) virus.

Bact. Rev., 31, 110-131

Schildkraut, C.L., J. Marmur and P. Doty (1962): Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its boyant density in CsCl.

J. Mol. Biol., 4, 430-443

Seehafer, J., A. Salmi, D.G. Scraba and J.S. Colter (1975): A comparative study of BK and polyoma viruses.

Virology, 66, 192-205

Serra, A. (1924): Studi sul virus della verruca, del papilloma, del condiloma acuminato (etiologia, patogenesi, filtrabilita): nota preventiva.

Giorn. Ital. Mal. Venereol., 65, 1808-1814

Sharp, P.A., B. Sugden and J. Sambrook (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-Etbr electrophoresis.

Biochemistry, 12, 3055-3063

Smith, H.O. and K.W. Wilcox (1970): A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. 1. Purification and general properties.

J. Mol. Biol., 51, 379-391

Tai, H.R., C.A. Smith, P.A. Sharp and J. Vinograd (1972): Sequence heterogeneity in closed simian virus 40 deoxyribonucleic acid.

J. Virol., 9, 317-325

Ullman, E.V. (1923): On the aetiology of the laryngeal papilloma. Acta Oto-Laryngol., 5, 317-334

Valentine, C., B.M. Shapiro and R.E. Stadtman (1968): Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from Escherichia coli.

Biochemistry, 7, 2143-2152

Weigle, J.M., M. Meselson and K. Paigen (1959): Density alteration associated with transducing ability in the bacteriophage Lambda.

J. Mol. Biol., 1, 379-386

Wilson, G.A. and F.E. Young (1975): Isolation of a sequence-specific endonuclease (Bam I) from Bacillus amyloliquefaciens H.

J. Mol. Biol., 97, 123-125

Wolf, H. (1974): Untersuchungen zur Regulation der Epstein-Barr Virus-Synthese und zum Nachweis viraler Nukleinsäure in Tumormaterial.

Dissertation. Naturwissenschaftliche Fakultät der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg

zur Hausen, H. (1976): Condylomata acuminata and human genital cancer.

Cancer Research, 36, 794

zur Hausen, H. (in Vorbereitung): Human papilloma viruses and their possible role in human squamous cell carcinoma.

zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford and L. Santesson (1970): EBV-DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx.

Nature (London), 228, 1056-1058

zur Hausen, H., W. Meinhof, W. Scheiber and G.W. Bornkamm (1974): Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. Int. J. Cancer, 13, 650-656

zur Hausen, H., L. Gissmann, W. Steiner, W. Dippold and I. Dreger (1976): Human papilloma viruses and cancer.

Bibliotheca Haematol., 43, 569-571

Herrn Professor Dr. H. zur Hausen möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Verlauf der Arbeit danken, Frau Professor Dr. H. Kersten danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn A. Rösch, der mich in die Bedienung der analytischen Ultrazentrifuge eingewiesen hat. Allen Mitgliedern des Institutes für Klinische Virologie danke ich für ihre Hilfe, ganz besonders Frau U. Klenner und Herrn H. Pfister für die erfreuliche Zusammenarbeit.

Lebenslauf

18.9.1949	als Sohn des kaufm. Angest. Hans Gissmann und seiner Ehefrau Jutta, geb. Silke in Kaufbeuren/Allgäu geboren
Sept. 55 - Juli 59	Besuch der Evang. Volksschule in Kaufbeuren
Sept. 59 - Juli 69	Besuch des Staatl. Gymnasiums, Kaufbeuren
Nov. 69 - Februar 75	Studium der Biologie an der Friedrich-Alexan- der-Universität Erlangen-Nürnberg
2.5.1972	Vordiplomprüfung
2.9.1974	Diplomprüfung Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung von defekten Phagen mit und ohne bakterizider Aktivität, angefertigt am Institut für Mikro- biologie in Erlangen
seit Sept. 1974	wiss. Angest. am Institut für Klinische Vi- rologie in Erlangen

Lutz Gissmann

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197